

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Institut de physiologie et biologie cellulaires - IPBC
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé
Secteur de recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :
Sylvain Fraineau

Effets cellulaires et voies de signalisation activés par le facteur anticoagulant, la protéine S, sur les cellules endothéliales : implication lors de l'angiogenèse

Directeur(s) de Thèse :
Omar Benzakour, Arnaud Monvoisin

Soutenue le 11 décembre 2012 devant le jury

Jury :

| | | |
|------------|--------------------------|---|
| Président | Jean-Marc Muller | Professeur, Université de Poitiers |
| Rapporteur | Marc Vasse | Professeur, Université de Paris 11 |
| Rapporteur | François Vallette | Directeur de recherche, Université de Nantes |
| Membre | Omar Benzakour | Professeur, Université de Poitiers |
| Membre | Arnaud Monvoisin | Maître de conférences, Université de Poitiers |
| Membre | Olivier Oudar | Professeur, Université de Paris 13 |

Pour citer cette thèse :

Sylvain Fraineau. *Effets cellulaires et voies de signalisation activés par le facteur anticoagulant, la protéine S, sur les cellules endothéliales : implication lors de l'angiogenèse* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2012. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National – Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale Bio-Santé

Biologie, Médecine, Santé
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présenté par

Sylvain FRAINEAU

Effets cellulaires et voies de signalisation activés par le facteur anticoagulant, la protéine S, sur les cellules endothéliales : implication lors de l'angiogenèse

Directeur de Thèse : **Pr. Omar BENZAKOUR**
Co-directeur de Thèse : **Dr. Arnaud MONVOISIN**

Soutenue le 11 Décembre 2012

Devant la Commission d'Examen

JURY

Pr. Marc Vasse
Dr. François Vallette
Pr. Olivier Oudar
Pr. Jean-Marc Muller
Dr. Arnaud Monvoisin
Pr. Omar Benzakour

Professeur, Université de Paris 11
Directeur de Recherche, Université de Nantes
Professeur, Université de Paris 13
Professeur, Université de Poitiers
Maître de Conférences, Université de Poitiers
Professeur, Université de Poitiers

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National – Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale Bio-Santé

Biologie, Médecine, Santé
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présenté par

Sylvain FRAINEAU

Effets cellulaires et voies de signalisation activés par le facteur anticoagulant, la protéine S, sur les cellules endothéliales : implication lors de l'angiogenèse

Directeur de Thèse : **Pr. Omar BENZAKOUR**
Co-directeur de Thèse : **Dr. Arnaud MONVOISIN**

Soutenue le 11 Décembre 2012

Devant la Commission d'Examen

JURY

| | | |
|-----------------------|---|------------|
| Pr. Marc Vasse | Professeur, Université de Paris 11 | Rapporteur |
| Dr. François Vallette | Directeur de Recherche, Université de Nantes | Rapporteur |
| Pr. Olivier Oudar | Professeur, Université de Paris 13 | Examineur |
| Pr. Jean-Marc Muller | Professeur, Université de Poitiers | Examineur |
| Dr. Arnaud Monvoisin | Maître de Conférences, Université de Poitiers | Examineur |
| Pr. Omar Benzakour | Professeur, Université de Poitiers | Examineur |

Effets cellulaires et voies de signalisation activés par le facteur anticoagulant, la protéine S, sur les cellules endothéliales : implication lors de l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus physiologique qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant et est régulée par l'équilibre entre les facteurs endogènes pro- et anti-angiogéniques. La rupture de cet équilibre est associée à de nombreuses pathologies dont l'ischémie, la rétinopathie ou encore la progression tumorale. Etant donné que les cellules endothéliales, principal type cellulaire composant les vaisseaux sanguins, expriment les récepteurs à activité tyrosine kinase du facteur anticoagulant, la protéine S, Tyro3, Axl et Mer et produisent de la protéine S, l'objectif de ce travail est d'étudier le rôle de la protéine S dans l'angiogenèse. Dans la première partie de ce travail, nous avons montré *in vivo* que la protéine S inhibe l'angiogenèse induite par les facteurs pro-angiogéniques (VEGFA et FGF2). Parallèlement, nous avons observé *in vitro* une inhibition par la protéine S de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales induites par le VEGFA. Cet effet est corrélé à l'inhibition par la protéine S des voies de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2 et de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) induites par le VEGFA. Nous avons ensuite mis en évidence, par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et de petits ARN interférents, que la protéine S inhibe, via l'activation du récepteur Mer et le recrutement de la protéine phosphatase SHP2, l'activation du VEGFR2, le principal récepteur du VEGFA. Dans la deuxième partie, nous avons montré de manière intéressante que le rôle joué par la protéine S lors de l'angiogenèse est plus complexe, puisqu'elle est capable d'activer directement la voie de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2 et d'induire la prolifération des cellules endothéliales. Ces effets cellulaires et moléculaires requièrent l'activation du récepteur Mer, puis le recrutement de la protéine kinase SRC permettant alors l'activation de la protéine phosphatase SHP2 responsable de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2. Nos résultats décrivent pour la première fois un rôle régulateur de la protéine S sur l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*, ce qui ouvre la voie au développement de nouveaux traitements pro- ou anti-angiogéniques.

Mots clés : Protéine S, angiogenèse, prolifération, migration, voies de signalisation, VEGFA

Laboratoire : Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires (IPBC), CNRS FRE 3511

Bât B36, Pôle Biologie Santé – 1, rue Georges Bonnet BP633
86022 Poitiers Cedex

**Cellular effects and signaling pathways activated by the anticoagulant factor,
protein S, on endothelial cells in the angiogenic process**

Angiogenesis is a physiological process that leads to new blood vessel formation and is regulated by a balance between pro- and anti-angiogenic endogenous factors. Disruption of this balance leads to many pathologies such as ischemia, retinopathies or tumor growth. Because endothelial cells, the main cellular type composing blood vessels, produce the anticoagulant factor, protein S and express its tyrosine kinase receptors Tyro3, Axl and Mer, we investigated the implication of protein S in angiogenesis. In the first part of this work, we demonstrated that protein S inhibits pro-angiogenic factors (VEGFA and FGF2)-induced angiogenesis *in vivo*. We also observed an inhibition of VEGFA-dependent endothelial cell proliferation and migration induced by protein S. These effects were correlated with protein S induced inhibition of VEGFA-dependent MAP-Kinases (Erk1, Erk2) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activation. Furthermore, we demonstrated, using pharmacological inhibitors and small interfering RNAs, that protein S inhibits VEGFA-induced VEGFR-2 activation through Mer receptor activation and SHP2 protein phosphatase recruitment. In the second part, we demonstrated that, protein S on its own, is able to induce MAP-Kinases Erk 1/2 pathway activation and endothelial cells proliferation. These cellular and molecular effects involved Mer receptor and SHP2 protein activation and required protein kinase SRC recruitment. Our results describe for the first time that protein S is an endogenous regulator for angiogenesis both *in vitro* and *in vivo* and may form the framework for the use of protein S as part of an anti-angiogenic treatment.

Key words : Protein S, angiogenesis, proliferation, migration, signaling pathways, VEGFA

Institute : Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires (IPBC), CNRS FRE 3511

Bât B36, Pôle Biologie Santé – 1, rue Georges Bonnet BP633

86022 Poitiers Cedex

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Pr. Frédéric Becq pour son accueil au sein de l'institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires (IPBC) FRE 3511.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes directeurs de thèse, le Pr. Omar Benzakour et le Dr. Arnaud Monvoisin. Je remercie le Pr. Omar Benzakour qui m'a accueilli au sein de son équipe et m'a confié ce sujet de thèse. Merci de m'avoir encadré, accompagné au cours de ces trois dernières années, de m'avoir transmis une partie de vos connaissances. Je remercie sincèrement le Dr Arnaud Monvoisin pour son encadrement, ses conseils et son soutien au cours de ces trois années de thèses. Merci d'avoir passé autant de temps à relire et à apporter des corrections à ce manuscrit. Je vous remercie vivement de m'avoir enseigné toutes les techniques utilisées pendant ma thèse, de m'avoir apporté la rigueur scientifique nécessaire à leur mise en place et l'esprit critique nécessaire pour l'analyse de leurs résultats. J'espère que vous trouverez, à travers ce manuscrit la preuve de ma reconnaissance pour m'avoir suivi tout au long de ces années et de mon profond respect à votre égard.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Pr. Marc Vasse et au Dr. François Vallette pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi qu'aux Pr. Olivier Oudar et Jean-Marc Muller pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie l'ensemble des enseignants de la section CNU 65 pour leur confiance et leur soutien. Je tiens à remercier plus particulièrement le Dr. Marianne Bernard pour ses conseils précieux lors de la préparation de mes enseignements. Merci à Catherine Adolphe pour son aide et son implication lors des travaux pratiques de biologie cellulaire.

Je remercie l'ensemble du groupe « PVKDs » et de l'équipe « SCMS » pour leur aide, leur attention, leurs critiques constructives et pour avoir supporté mes réunions interminables. Je remercie particulièrement le Dr. Michel Philippe à qui je dois tout ce que je sais sur le Western blot. Je le remercie également pour sa disponibilité, sa compréhension et sa gentillesse. Je remercie Aurélie (petit chou) pour sa gentillesse, son écoute et son soutien même si sa culture cinématographique reste approximative.

Remerciements

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe « PCDC » pour leur humour, leur bonne humeur et leur soutien à chaque pause café. Je remercie plus particulièrement le Dr. Annie Claire Balandre pour avoir toujours été là en cas de problème et pour sa gentillesse. Merci aux différents étudiants que j'ai eu le plaisir d'encadrer ou de côtoyer au cours de leurs stages, je leur souhaite le meilleur pour la suite.

Je tiens à remercier l'ensemble des doctorants de l'IPBC présents et passés qui sont devenus de vrais amis : merci à Jo qui m'a tout appris sur la biologie moléculaire et sans qui, c'est certain, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui. Ce fut un honneur et un réel plaisir pour moi de travailler avec toi. Félicitation pour ton mariage avec Sandrine qui est sans doute la gentillesse même, je vous souhaite le meilleur. Merci à Coco et Doudou qui ont toujours su lire en moi comme dans un livre ouvert, qui m'ont conseillé, soutenu et fais rire. Merci à Goudi et sa petite famille (Arnaud et à Léana), merci pour ton honnêteté, ta sincérité. Ces remerciements ne rendent pas justice à l'importance que vous avez eue ces dernières années et j'espère un jour pouvoir vous renvoyer l'ascenseur. Merci à PO et Anna qui restent indissociable pour moi, je retiendrai la pensée philosophique « que tu sois mouillé 1 min ou 10 min, ben au final t'es mouillé quand même ». Merci à Johanna, Claudia et Charlotte pour toutes ces soirées rigolades, à Dorothée pour ces deux années de collocation hors du temps (je ne joue plus au 421 depuis), à Laurie-Anne et Erwan on retourne camper quand vous voulez !

Je remercie mes amis d'Oléron et d'ailleurs pour leur bonne humeur, leur capacité à me changer les idées. Merci de me soutenir, de me faire rire à chaque occasion. Je vous souhaite à tous le meilleur à venir. Votre amitié à tous n'a pas de prix à mes yeux !

Un grand merci à toute ma famille : mes parents dont le soutien et l'affection indéfectibles ont été mon moteur ces dernières années. Merci d'avoir relu et corrigé mon manuscrit (je ferai attention à l'accord des participes passés à l'avenir !). Je n'ai malheureusement pas de mots pour vous exprimer toute ma gratitude. Merci à ma sœur et mon frère qui me soutiennent malgré la distance. Merci à ma grand-mère et à ma tante qui ont toujours eu une petite pensée pour moi. Je suis fier et heureux de faire partie de cette famille que je prends en exemple tous les jours.

Enfin comme il faut garder le meilleur et en l'occurrence la meilleure pour la fin, je remercie Elodie qui depuis qu'elle est entrée dans ma vie m'a soutenu, supporté et qui a toujours cru en moi. Merci pour ta tendresse, ton extrême gentillesse au quotidien... En résumé merci pour tout, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui sans toi.

Avant propos

Mon travail de thèse a été effectué du mois d'octobre 2009 au mois de septembre 2012 au sein de l'UMR CNRS 6187 (CNRS FRE 3511 depuis le mois de janvier 2012) dirigé par le Pr. Frédéric Becq au sein de l'équipe 3 : Physiopathologie de la Communication et Différenciation Cellulaires dont le responsable est le Pr. Marc Mesnil. L'axe thématique du groupe « Protéines Vitamine K-Dépendantes » (PVKD) dirigé par le Pr. Omar Benzakour dans lequel j'ai réalisé ma thèse centre ses travaux autour du rôle de ces protéines (PVKD) dans divers processus biologiques tels que la phagocytose, l'activité des cellules souches neurales, la croissance tumorale et l'angiogenèse. Mon projet de thèse, codirigé par le Pr. Omar Benzakour et le Dr. Arnaud Monvoisin, s'est focalisé sur le rôle d'une protéine vitamine K-dépendante particulière : la protéine S, au cours d'un processus biologique particulier : l'angiogenèse.

Les travaux réalisés au cours de mon stage Master 2 en 2008 dans la même équipe avaient mis en évidence le rôle joué par la protéine S au cours de la croissance tumorale ainsi que le rôle anti-angiogénique de la protéine S *in vivo*. L'équipe d'accueil n'ayant pas bénéficié d'une bourse de thèse, j'ai travaillé en tant que technicien dans le laboratoire de cryobiologie de l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Poitiers du mois de janvier au mois de septembre 2009, en attendant l'attribution d'une bourse de thèse (octobre 2009). Cette thématique, poursuivie par Julie Talbot durant son stage de Master 2 l'année précédant mon arrivée en thèse, a mis en évidence le rôle joué par la protéine S au cours de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales dépendantes du VEGFA.

Suite à ces premiers travaux, nous avons orienté ma thèse sur le rôle de la protéine S au cours de la croissance tumorale et de l'angiogenèse. En outre, j'ai été impliqué dans un autre aspect des travaux de l'équipe concernant l'inhibition de la croissance tumorale *in vivo* et *in vitro* ainsi que la dissémination de métastases *in vivo* par des protéines vitamine K-dépendantes. Ces travaux font aujourd'hui partie d'un brevet non abordé dans ce manuscrit pour des raisons de confidentialité (Invention déposé à l'INPI le 14 novembre 2011 au nom du CNRS et de l'Université de Poitiers, n° dossier : BR89500SLHKC).

Parallèlement à ces travaux, j'ai approfondi les résultats obtenus concernant l'effet anti-angiogénique exercé par la protéine S et j'ai développé un autre aspect de ces résultats : le rôle direct joué par la protéine S sur les cellules endothéliales. L'ensemble de ces travaux est rapporté dans ce manuscrit.

Avant propos

La première partie de ce manuscrit est une étude bibliographie portant sur l'angiogenèse et sa régulation, ainsi que sur la protéine S, ses récepteurs TAM et les nouveaux rôles qui lui sont attribués en tant que ligand. Dans cette partie je détaille plus particulièrement le rôle joué par le VEGFA dans l'angiogenèse et la régulation de sa signalisation par la famille des protéines phosphatases. Cette partie se termine par une synthèse des connaissances actuelles concernant l'implication de la protéine S dans le système vasculaire.

Après avoir décrit les différentes techniques utilisées pour mener à bien ce projet dans une deuxième partie, je décris les résultats obtenus concernant le rôle anti-angiogénique de la protéine S. Ces travaux, acceptés pour publication dans le journal Blood le 18 septembre 2012, sont actuellement disponibles en tant que première édition en ligne en attendant leur publication. Le deuxième chapitre de la partie résultats décrit le rôle direct joué par la protéine S sur les cellules endothéliales. Ces travaux feront l'objet d'une publication en cours de rédaction.

Enfin, dans la dernière partie du manuscrit, je discute l'ensemble de ces résultats, notamment les deux rôles joués par la protéine S dans le système vasculaires et ouvre des perspectives quant à la poursuite de ces travaux.

Souhaitant poursuivre la compréhension du rôle joué par les facteurs de la coagulation sanguine dans le système vasculaire, j'ai été associé à une demande de financement européen via le programme Marie Curie intitulé « Factor VII activating protease (FSAP): A novel molecular link between coagulation and angiogenesis », dont l'auteur et le coordinateur est le Pr. Sandip Kanse (université d'Oslo, Norvège) en collaboration avec le Pr. Omar Benzakour. Cette demande de financement s'il elle est accordée me permettrait d'étudier, au sein du laboratoire du Pr. Sandip Kanse sous la forme d'un stage post-doctoral, le rôle joué par le facteur VII de la coagulation sanguine dans le système vasculaire.

Lors de ma dernière année de thèse (2011/2012) j'ai effectué 64 h d'enseignements dans la section CNU 65 (Biologie Cellulaire) dont le coordinateur est le Pr. Jean-Marc Muller. Au cours de ces 3 années de thèse, j'ai participé et présenté mon travail dans 2 congrès internationaux (Cell Signaling, Luxembourg 2011 et International Vascular Biology Meeting, Wiesbaden 2012) ainsi qu'aux 2 congrès de la Société Française d'Angiogenèse (Montpellier 2010 et Bordeaux 2011). Le Groupe Poitevin de la Recherche contre le Cancer m'a attribué en 2012, lors de leur 3^{ème} journée, le prix de la meilleure présentation orale.

Table des matières

| | |
|---|----|
| Index des figures | 15 |
| Index des Tableaux..... | 18 |
| Abréviations | 19 |
| Introduction | 27 |
| Chapitre 1 : L'angiogenèse | 27 |
| 1 L'angiogenèse physiologique..... | 29 |
| 1.1 Structure et fonction du système vasculaire | 29 |
| 1.1.1 Les artères et veines | 29 |
| 1.1.1.1 L'intima | 29 |
| 1.1.1.2 La média | 31 |
| 1.1.1.3 L'adventice..... | 31 |
| 1.1.2 Les artérioles et veinules | 31 |
| 1.1.3 Les capillaires..... | 31 |
| 1.2 Formation et développement du système vasculaire..... | 33 |
| 1.2.1 Vasculogenèse ou la formation de l'arbre vasculaire..... | 33 |
| 1.2.2 Angiogenèse ou l'expansion du réseau vasculaire primitif..... | 33 |
| 1.2.2.1 Angiogenèse par bourgeonnement « sprouting » | 35 |
| 1.2.2.2 Angiogenèse par « intussusception » | 37 |
| 1.2.2.3 Angiogenèse par septation | 37 |
| 2 L'angiogenèse tumorale | 39 |
| 2.1 Mécanismes de la vascularisation tumorale | 39 |
| 2.1.1 Vasculogenèse | 39 |
| 2.1.2 Angiogenèse par intussusception | 39 |
| 2.1.3 Cooptation vasculaire | 41 |
| 2.1.4 Imitation vasculaire | 41 |
| 2.1.5 Différenciation des cellules souches tumorales en cellules endothéliales..... | 41 |
| 2.2 Morphologie des vaisseaux tumoraux | 43 |
| 2.3 Le concept de commutation ou « switch » angiogénique | 45 |
| 2.4 Micro-environnement tumoral | 47 |
| 2.4.1 La matrice extracellulaire | 47 |
| 2.4.2 Les cellules murales | 47 |
| 2.4.3 Les cellules hématopoïétiques circulantes | 47 |
| 2.4.4 Les fibroblastes | 49 |
| 2.4.5 Les cellules endothéliales..... | 49 |
| Chapitre 2 : Régulation de l'angiogenèse | 51 |
| 1 Les facteurs pro-angiogéniques..... | 53 |
| 1.1 Le VEGF | 53 |
| 1.1.1 La famille du VEGF et ses récepteurs..... | 53 |
| 1.1.2 Gène, synthèse et régulation..... | 57 |
| 1.1.3 Signalisation induite par le VEGFA..... | 61 |
| 1.2 Le FGF2 | 67 |
| 1.3 Le PDGF | 69 |
| 1.4 Le système angiopoïétines-récepteur Tie2..... | 69 |
| 1.5 Les Métalloprotéinases Matricielles..... | 71 |
| 1.6 Les cytokines pro-angiogéniques | 71 |

Table des matières

| | | |
|---|---|-----|
| 1.6.1 | TGF- β | 71 |
| 1.6.2 | TNF- α | 73 |
| 1.7 | Les micro-ARN (miRNA) | 73 |
| 2 | Les facteurs anti-angiogéniques | 77 |
| 2.1 | Les facteurs anti-angiogéniques endogènes | 77 |
| 2.2 | Les facteurs anti-angiogéniques dérivés de la matrice extracellulaire | 77 |
| 2.2.1 | L'endostatine | 77 |
| 2.2.2 | Les thrombospondines (TSPs) | 79 |
| 2.3 | Les facteurs de croissance et les cytokines | 81 |
| 2.3.1 | Le Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) | 81 |
| 2.3.2 | Les Interleukines | 81 |
| 2.4 | Autres facteurs anti-angiogéniques | 81 |
| 2.4.1 | L'angiostatine | 81 |
| 2.4.2 | Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) | 83 |
| 2.5 | Les inhibiteurs du VEGF et de sa signalisation | 83 |
| 2.5.1 | Les anticorps ciblant le VEGF et sa signalisation | 83 |
| 2.5.2 | Les protéines phosphatases SHP1 et SHP2 | 85 |
| 2.5.2.1 | La famille des protéines phosphatases intracellulaires (PTPs) | 85 |
| 2.5.2.2 | Les protéines SHPs | 87 |
| 2.5.2.3 | SHP1 | 91 |
| 2.5.2.4 | SHP2 | 93 |
| Chapitre 3 : La protéine S et ses récepteurs | | 99 |
| 1 | La protéine S | 99 |
| 1.1 | Découverte et rôle historique | 99 |
| 1.2 | Déficiences en protéine S | 101 |
| 1.3 | Gène et synthèse | 103 |
| 1.4 | Structure protéique | 105 |
| 1.5 | Régulation post-traductionnelle : une protéine γ -carboxylée | 107 |
| 1.6 | Nouvelles fonctions de la protéine S | 109 |
| 2 | Les récepteurs TAM de la protéine S | 111 |
| 2.1 | Nomenclature | 113 |
| 2.2 | Expression | 115 |
| 2.3 | Structure et activation | 117 |
| 2.4 | Signalisation et fonctions cellulaires | 119 |
| 2.4.1 | Tyro3 | 119 |
| 2.4.2 | Axl | 121 |
| 2.4.3 | Mer | 123 |
| 3 | La protéine S, les récepteurs TAM et le système vasculaire | 129 |
| Objectifs de l'étude | | 135 |
| Approches expérimentales et techniques mises en œuvre | | 139 |
| 1 | Modèles cellulaires | 139 |
| 1.1 | Cellules endothéliales humaines | 139 |
| 1.2 | Cellules de Sertoli murines | 141 |
| 2 | Modèle animal | 141 |
| 3 | Test de vascularisation du « bouchon de Matrigel » <i>in vivo</i> | 143 |
| 3.1 | Injection sous-cutanée des bouchons de Matrigel | 143 |
| 3.2 | Analyse histologique | 143 |
| 4 | Interférence par petits ARN | 145 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 5 | Test de morphogenèse : formation de structures capillaires par les cellules endothéliales <i>in vitro</i> | 149 |
| 5.1 | Conditions basales..... | 149 |
| 5.2 | Transfection de siRNA..... | 149 |
| 6 | Test de prolifération cellulaire par incorporation de la Bromodéoxyuridine..... | 151 |
| 6.1 | Conditions basales..... | 151 |
| 6.2 | Inhibition de l'activation des voies de signalisation par traitement pharmacologique | 153 |
| 6.3 | Inhibition de l'activation des récepteurs TAM par utilisation d'anticorps bloquants | 155 |
| 6.4 | Transfection par siRNA | 155 |
| 7 | Test de migration cellulaire par la technique de la chambre de Boyden..... | 157 |
| 8 | Mesure du taux d'expression des ARNm par RT-PCR quantitative (RT-qPCR) ... | 159 |
| 8.1 | Extraction des ARN totaux | 159 |
| 8.2 | Transcription inverse..... | 159 |
| 8.3 | Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel..... | 161 |
| 8.4 | Validation des amorces utilisées au cours des expériences de PCR quantitative en temps réel (qPCR) | 163 |
| 9 | Mesure du taux d'expression et d'activation des protéines par Western blotting... | 167 |
| 9.1 | Expression protéique | 167 |
| 9.2 | Activation des voies de signalisation | 169 |
| 9.2.1 | Conditions basales..... | 169 |
| 9.2.2 | Transfection par siRNA | 171 |
| 10 | Analyses statistiques | 171 |
| | Résultats | 175 |
| | Chapitre 1 : Inhibition de l'angiogenèse par la protéine S | 175 |
| 1 | La protéine S inhibe l'angiogenèse induite par les facteurs angiogéniques <i>in vivo</i> | 175 |
| 2 | La protéine S inhibe la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales <i>in vitro</i> | 179 |
| 3 | La protéine S inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales dépendante du VEGFA | 181 |
| 3.1 | La protéine S inhibe la prolifération des cellules endothéliales dépendante du VEGFA..... | 181 |
| 3.2 | La protéine S inhibe la migration des cellules endothéliales dépendante du VEGFA..... | 183 |
| 4 | Régulation de l'activation du VEGFR2 par la protéine S | 185 |
| 5 | La protéine phosphatase SHP2 médie l'effet anti-angiogénique de la protéine S .. | 187 |
| 5.1 | Les protéines phosphatases SHPs sont impliquées dans les effets anti-angiogéniques de la protéine S | 187 |
| 5.2 | La protéine phosphatases SHP2 est responsable de l'inhibition de la prolifération induite par la protéine S | 189 |
| 5.2.1 | Modèle de répression par petits ARN interférents (siRNA) | 189 |
| 5.2.2 | La protéine phosphatase SHP2 médie l'effet anti-prolifératif induit par la protéine S..... | 191 |
| 5.3 | Activation de la protéine phosphatase SHP2 par la protéine S | 191 |
| 6 | Rôle des récepteurs TAM dans l'effet anti-angiogénique de la protéine S..... | 193 |
| 6.1 | Expression des récepteurs TAM dans les cellules endothéliales | 193 |
| 6.2 | Validation du modèle de répression des récepteurs TAM par siRNA | 195 |
| 6.3 | Le récepteur Mer médie l'effet anti-prolifératif induit par la protéine S | 197 |

Table des matières

| | | |
|---|---|-----|
| 6.4 | La protéine S active le récepteur Mer | 199 |
| 7 | Le récepteur Mer est essentiel pour le recrutement de la phosphatase SHP2 induite par la protéine S..... | 201 |
| 8 | Le récepteur Mer et la protéine phosphatase SHP2 sont responsables de l'effet anti-angiogénique de la protéine S | 203 |
| 9 | Conclusion : la protéine S est un inhibiteur endogène de l'angiogenèse | 205 |
| Chapitre 2 : Rôle direct de la protéine S sur les cellules endothéliales..... | | 207 |
| 1 | La protéine S induit la prolifération des cellules endothéliales et active la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 | 207 |
| 1.1 | La protéine S active la prolifération des cellules endothéliales | 207 |
| 1.2 | Voies de signalisation activées par la protéine S | 207 |
| 1.3 | L'activation de la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 est essentielle à la prolifération des cellules endothéliales induite par la protéine S..... | 209 |
| 2 | La protéine S active la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 via le récepteur Mer..... | 209 |
| 3 | La protéine phosphatase SHP2 médie les effets cellulaires et moléculaires induits par la protéine S..... | 211 |
| 3.1 | Les protéines phosphatases SHPs sont responsables de l'activation de la voie de MAP-Kinases Erk 1/2 induite par la protéine S | 211 |
| 3.2 | La protéine phosphatase SHP2 est essentielle lors de prolifération des cellules endothéliales induite par la protéine S | 211 |
| 3.3 | La protéine SHP2 médie l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induite par la protéine S | 213 |
| 4 | La protéine c-Src médie la signalisation induite par la protéine S..... | 215 |
| 5 | Conclusion : la protéine S est un agent mitogène pour les cellules endothéliales .. | 217 |
| Discussion et perspectives..... | | 219 |
| Bibliographie | | 233 |
| Ouvrages..... | | 233 |
| Articles et revues | | 234 |
| Annexes | | 267 |
| Annexe 1 : Expression de la protéine Mer après 24 h et 48 h de transfection avec 5 nM de siRNA..... | | 267 |
| Annexe 2 : Expression de la protéine phosphatase SHP2 après 24 h et 48 h de transfection avec 5 nM de siRNA | | 268 |
| Annexe 3 : Curriculum vitae | | 269 |
| Annexe 4 : Article publié | | 272 |

Index des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Schéma de la structure d'une artère | 28 |
| Figure 2 : Implication de l'endothélium dans des processus physiopathologiques | 28 |
| Figure 3 : Structure des différents types de vaisseaux sanguins | 30 |
| Figure 4 : Vasculogenèse embryonnaire | 32 |
| Figure 5 : Formation embryonnaire de l'arbre vasculaire | 32 |
| Figure 6 : Les étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement « sprouting » | 34 |
| Figure 7 : Les étapes de l'angiogenèse par « intussusception » | 36 |
| Figure 8 : Les étapes de vascularisation tumorale | 36 |
| Figure 9 : Les différents types de vascularisation tumorale | 38 |
| Figure 10 : Vascularisation tumorale par cooptation vasculaire | 40 |
| Figure 11 : Morphologie des vaisseaux sanguins normaux et tumoraux | 40 |
| Figure 12 : Concept de commutation « switch » angiogénique et normalisation de la vascularisation tumorale | 42 |
| Figure 13 : Influence du micro-environnement endothélial sur la maturation des vaisseaux sanguins | 44 |
| Figure 14 : Contribution du micro-environnement au cours de l'angiogenèse tumorale | 46 |
| Figure 15 : Représentation schématique non exhaustive des facteurs endogènes impliqués lors du « switch » angiogénique | 50 |
| Figure 16 : Structures comparées des membres de la famille du VEGF | 52 |
| Figure 17 : Les membres de la famille du VEGF et leurs récepteurs | 54 |
| Figure 18 : Structure du gène du VEGFA | 56 |
| Figure 19 : Structure du promoteur du gène du VEGFA | 56 |
| Figure 20 : Les différentes isoformes de pré-ARNm du VEGFA | 58 |
| Figure 21 : Structure et effets cellulaires du VEGFR1 | 60 |
| Figure 22 : Signalisation et effets cellulaires induits par le couple VEGFA/VEGFR2 | 62 |
| Figure 23 : Implication du FGF au cours des événements cellulaires | 66 |
| Figure 24 : Implication du PDGF au cours de l'angiogenèse | 68 |
| Figure 25 : Implication du TGF- β au cours de l'angiogenèse | 70 |
| Figure 26 : Régulation de l'angiogenèse par les miRNAs | 72 |
| Figure 27 : Exemple de ciblage de la signalisation du VEGFR2 | 82 |
| Figure 28 : Structure de la famille des PTP « classiques » | 84 |
| Figure 29 : Structure et activation des protéines SHPs | 88 |
| Figure 30 : Structure de SHP1 | 90 |
| Figure 31 : Structure de SHP2 | 92 |
| Figure 32 : Voies de signalisation induites par SHP2 | 94 |
| Figure 33 : Participation de la protéine S dans le système de la coagulation | 98 |
| Figure 34 : C4b-BP et activité anticoagulante de la protéine S | 98 |
| Figure 35 : Localisation des différentes mutations du gène <i>PROS1</i> liées à une déficience en protéine S | 100 |
| Figure 36 : Phénotype des souris Knock Out pour le gène <i>PROS1</i> (-/-) | 102 |
| Figure 37 : Structure schématique de la protéine S humaine | 104 |
| Figure 38 : La réaction de γ -carboxylation | 106 |
| Figure 39 : Structure des récepteurs TAM | 116 |
| Figure 40 : Mode d'activation des récepteurs TAM | 116 |
| Figure 41 : Voies de signalisation induites par le récepteur Tyro3 | 118 |
| Figure 42 : Voies de signalisation induites par le récepteur Axl | 120 |
| Figure 43 : Voies de signalisation induites par le récepteur Mer | 122 |

| | |
|---|-----|
| Figure 44 : Mécanismes de l'interférence par petit ARN (siRNA)..... | 144 |
| Figure 45 : Toxicité de la transfection des HUVECs..... | 146 |
| Figure 46 : Validation des amorces pour les expériences de PCR quantitative en temps réel (qPCR), exemple du récepteur tyrosine kinase Tyro3 | 164 |
| Figure 47 : La protéine S inhibe l'angiogenèse <i>in vivo</i> | 174 |
| Figure 48 : La protéine S inhibe la vascularisation des bouchons de Matrigel <i>in vivo</i> | 176 |
| Figure 49 : La protéine S inhibe la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales <i>in vitro</i> | 178 |
| Figure 50 : Le VEGFA est essentiel à la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales <i>in vitro</i> | 178 |
| Figure 51 : La protéine S inhibe la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA..... | 180 |
| Figure 52 : La protéine S inhibe l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induite par le VEGFA..... | 182 |
| Figure 53 : La protéine S inhibe la migration des cellules endothéliales dépendante du VEGFA..... | 182 |
| Figure 54 : La protéine S inhibe l'activation de la voie de la PI3Kinase/Akt dépendante du VEGFA..... | 184 |
| Figure 55 : La protéine S inhibe la phosphorylation VEGFR2 induit par le VEGFA | 184 |
| Figure 56 : Les protéines phosphatases SHPs médient l'effet inhibiteur exercé par la protéine S sur la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA..... | 186 |
| Figure 57 : Les protéines phosphatases SHPs médient l'inhibition des voies de signalisation induite par le VEGFA exercé par la protéine S..... | 186 |
| Figure 58 : Expression protéique de SHP1 et 2 après 48 h de transfection par siRNA | 188 |
| Figure 59 : Expression protéique de SHP1 et 2 après 72 h de transfection par siRNA | 188 |
| Figure 60 : La protéine phosphatase SHP2 médie l'effet inhibiteur exercé par la protéine S sur la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA | 190 |
| Figure 61 : La protéine S active la protéine phosphatase SHP2 | 190 |
| Figure 62 : Expression des ARNm des récepteurs TAM dans les cellules endothéliales | 192 |
| Figure 63 : Validation des siRNA dirigés contre les ARNm des récepteurs TAM après 24 h et 48 h de transfection | 194 |
| Figure 64 : Le récepteur Mer médie l'effet inhibiteur exercé par la protéine S sur la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA..... | 196 |
| Figure 65 : Le récepteur Mer médie l'effet inhibiteur exercé par la protéine S sur la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA et le FGF2..... | 196 |
| Figure 66 : La protéine S active le récepteur Mer humain et Mer murin..... | 198 |
| Figure 67 : Le récepteur Mer est essentiel pour l'activation de la protéine phosphatase SHP2 induite par la protéine S | 200 |
| Figure 68 : Le récepteur Mer et la protéine phosphatase SHP2 médient l'effet anti-angiogénique de la protéine S <i>in vitro</i> | 202 |
| Figure 69 : La protéine S, un inhibiteur endogène de l'angiogenèse | 204 |
| Figure 70 : La protéine S induit directement la prolifération des cellules endothéliales | 206 |
| Figure 71 : La protéine S active les voies de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2 et de la PI3K | 206 |
| Figure 72 : La voie de MAP-Kinase Erk 1/2 médie l'effet prolifératif induit par la protéine S sur les cellules endothéliales | 208 |
| Figure 73 : Le récepteur Mer médie l'effet prolifératif exercé par la protéine S | 208 |
| Figure 74 : La protéine S active la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 via le récepteur Mer..... | 208 |
| Figure 75 : Les protéines phosphatases SHPs médient l'activation de la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 induite par la protéine S..... | 210 |

Index des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 76 : La protéine phosphatase SHP2 est responsable de l'effet prolifératif exercé par la protéine S..... | 210 |
| Figure 77 : La protéine phosphatase SHP2 médie l'activation de la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 induite par la protéine S | 212 |
| Figure 78 : La protéine phosphatase SHP2 médie spécifiquement l'activation de la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 induite par la protéine S | 212 |
| Figure 79 : L'inhibition de l'activité de la protéine c-Src supprime le recrutement de la protéine phosphatase SHP2 et l'activation de la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 induits par la protéine S..... | 214 |
| Figure 80 : La protéine S, un agent mitogène pour les cellules endothéliales | 216 |

Index des Tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Rôle de certains miRNA au cours de l'angiogenèse | 74 |
| Tableau 2 : Anticorps ciblant la signalisation du VEGF et traitement de cancers | 82 |
| Tableau 3 : Protéines vitamine K-dépendantes avec activité protéolytique..... | 108 |
| Tableau 4 : Protéines vitamine K-dépendantes avec ou sans activité protéolytique..... | 108 |
| Tableau 5 : Nomenclature des récepteurs Tyro3, Axl et Mer | 112 |
| Tableau 6 : Phénotype associé à l'invalidation des récepteurs TAM chez la souris..... | 118 |
| Tableau 7 : Tableau récapitulatif des siRNA utilisés | 144 |
| Tableau 8 : Tableau récapitulatif des inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation utilisés..... | 152 |
| Tableau 9 : Tableau récapitulatif des couples d'amorces utilisés pour la qPCR | 160 |
| Tableau 10 : Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés pour la technique de Western blotting | 168 |
| Tableau 11 : Tableau récapitulatif des anticorps secondaires utilisés pour la technique de Western blotting | 168 |
| Tableau 12 : Expression des récepteurs TAM et leur implication dans les effets cellulaires induits par la protéine S..... | 224 |

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
Ala : Alanine
ALK : Activin receptor-Like Kinase
Ang : Angiopoïétine
ANOVA : ANalysis Of Variance
AP : Activator Protein
aPC : Protéine C activée
Arg : Arginine
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénosine TriPhosphate
AUF1 : AU-rich element binding Factor 1
BAD : Bcl-2 Associated Death promoter
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
C1-TEN : C1 domain-containing phosphatase and tensin homolog
Cbl : ubiquitine ligase C
CD 31 : Cluster of Differentiation 31
CDC42 : Cell Division Cycle 42
cDNA : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
CE : Cellules Endothéliales
CEL : Cellules Endothéliales Lymphatiques
CH : Cellules Hématopoïétiques
CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
CML : Cellules Musculaires Lisses
CPE : Cellules Progénitrices Endothéliales
c-Src : cellular-Src
Ct : Cycle threshold
Da : Dalton
DARC : Duffy Antigen Receptor of Chemokine
DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DNA : DeoxyriboNucleic Acid
dNTPs : déoxyriboNucléotide TriPhosphates

Abréviations

DTT : DiThioThreitol
EBM-2 : Endothelial cell Basal Medium-2
EBSS : Earle's Balanced Salt Solution
EC : Endothelial Cells
EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGF : Epidermal Growth Factor
EGM-2 : Endothelial cell Growth Medium-2
Egr : Early gene response protein
EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
eNOS : endothelial NO Synthase
ERE : oestrogen Receptor Element
Erk : Extracellular signal-regulated kinases
FAK : Focal-Adhesion Kinase
FasL : Fas Ligand
FB : Fibroblastes
FDA : Food and Drug Administration
FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2 (basic)
FGFR : FGF Receptor
Flk-1 : Fetal liver kinase-1
Flt-1 : Fms-related tyrosine kinase-1
GAPDH : GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase
Gas6 : Growth arrest-specific gene 6
Gla : acide γ -carboxy glutamique
Glu : acide glutamique
HBD : Heparin Binding Domain
HDF : Hepatoma-Derived growth Factor
HIF : Hypoxia-Inducible Factor
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HRP : Horse-Radish Peroxydase
HuR : RNA-binding protein human antigen R
HUVECs : Human Umbilical Vein Endothelial Cells
Hya : acide β -hydroxy aspartique
Hyn : β -hydroxy asparagine
IGF : Insulin-like Growth Factor

Abréviations

IL-6 : InterLeukine-6

JAK : Janus (Activated) Kinase

KDR : Kinase insert Domain containing Receptor

LamG : Laminine G

LEE : Limitante Elastique Externe

LEI : Limitante Elastique Interne

L-VEGF : Large-VEGF

LXR : Liver X Receptor

MAP-Kinase : Mitogen-Activated Protein Kinase

MB : Membrane Basale

MEC : Matrice ExtraCellulaire

miRNA : micro-RNA

MMP : Matrix MetalloProtéinase

Nck : Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1

NO : oxyde nitrique ou monoxyde d'azote

Nrp : Neuropilines

NFκB : Nuclear Factor κ B

PAR : Proteinase Activated Receptor

Pb : paire de bases

PBS : tampon phosphate salin

PC : Péricytes

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDGFR : PDGF Receptor

PECAM : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

PEDF : Pigment Epithelium-Derived Factor

Phe : Phénylalanine

PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase

PlGF : Placental Growth Factor

PIP₃ : Phosphatidylinositol (3,4,5) triPhosphate

PLCγ : Phospholipase C-γ

PP1 : Protéine Phosphatase 1

ProS : Protéine S

PTP : Protéine Tyrosine Phosphatase

Abréviations

PTPN : PTP Non-Transmembrane

PTPN6 : Phosphatase Tyrosine-Protein Non-receptor type 6

PTPN11 : Phosphatase Tyrosine-Protein Non-receptor type 11

PTPR : PTP Receptor-like

PRE : Progesterone Response Element

PVDF : PolyVinylidene DiFluoride

PVKD : Protéines Vitamine K-Dépendantes

RISC : RNA-Induced Silencing Complex

RNA : RiboNucleic Acid

RNAse : RiboNucléAse

RT : Reverse-Transcription

SD : Standard Deviation, écart-type

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SEM : Standard Error of the Mean, erreur standard de la moyenne

Ser : Sérine

SFKs : Src Family Kinases

siRNA : small interfering Ribonucleic Acid

SH2 domains : domaines d'homologie avec Src

Shb : Src homology 2 domain-containing adapter protein B

SHBG : Sex-Hormone-Binding Globulin

SHP1 : Src-homology-2-domain containing protein tyrosine phosphatase 1

SHP2 : Src-homology-2-domain containing protein tyrosine phosphatase 2

SOCS 1 : Supressor of Cytokine Signaling 1

Sp : Specificity Protein

Src : Transforming (sarcoma inducing) gene of Rous sarcoma virus

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

SVF : Sérum de Veau Foetal

TAF : Tumor Angiogenic Factor

TAM : Tyro3, Axl, Mer

TBS : Tampon Tris Salin

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

T β RII : TGF- β type II receptor

Thr : Thréonine

Tie-2 : Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains

Abréviations

TIMP : Tissue Inhibitors of Matrix MetalloProtéinases

TIS11 : Tetra-décanoyl Phorbol Acetate-induced-sequence-11

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

TSAd : T-cell-specific adaptator

TSP : ThromboSPondine

Tulp1 : Tubby-like protein 1

Tyr : Tyrosine

UNG : Uracil N-Glycosylase

uPA : urokinase Plasminogen Activator

VE-cadherine : Vascular Endothelial-cadherin

VEGFA : Vascular Endothelial Growth Factor-A

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VKOR : Vitamine K 2,3,-époxyde réductase

VPF : tumor Vascular Permeability Factor

VRAP : VEGF receptor-associated protein

3'-UTR : 3'-UnTranslated Region

Introduction

| | |
|---|-----|
| Chapitre 1 : L'angiogenèse | 27 |
| 1 L'angiogenèse physiologique..... | 29 |
| 1.1 Structure et fonction du système vasculaire | 29 |
| 1.2 Formation et développement du système vasculaire..... | 33 |
| 2 L'angiogenèse tumorale | 39 |
| 2.1 Mécanismes de la vascularisation tumorale | 39 |
| 2.2 Morphologie des vaisseaux tumoraux..... | 43 |
| 2.3 Le concept de commutation ou « switch » angiogénique | 45 |
| 2.4 Micro-environnement tumoral | 47 |
| Chapitre 2 : Régulation de l'angiogenèse | 51 |
| 1 Les facteurs pro-angiogéniques..... | 53 |
| 1.1 Le VEGF | 53 |
| 1.2 Le FGF2 | 67 |
| 1.3 Le PDGF | 69 |
| 1.4 Le système angiopoïétines-récepteur Tie2 | 69 |
| 1.5 Les Métalloprotéinases Matricielles..... | 71 |
| 1.6 Les cytokines pro-angiogéniques | 71 |
| 1.7 Les micro-ARN (miRNA)..... | 73 |
| 2 Les facteurs anti-angiogéniques | 77 |
| 2.1 Les facteurs anti-angiogéniques endogènes | 77 |
| 2.2 Les facteurs anti-angiogéniques dérivés de la matrice extracellulaire | 77 |
| 2.3 Les facteurs de croissance et les cytokines | 81 |
| 2.4 Autres facteurs anti-angiogéniques | 81 |
| 2.5 Les inhibiteurs du VEGF et de sa signalisation | 83 |
| Chapitre 3 : La protéine S et ses récepteurs | 99 |
| 1 La protéine S | 99 |
| 1.1 Découverte et rôle historique | 99 |
| 1.2 Déficiences en protéine S..... | 101 |
| 1.3 Gène et synthèse..... | 103 |
| 1.4 Structure protéique | 105 |
| 1.5 Régulation post-traductionnelle : une protéine γ -carboxylée..... | 107 |
| 1.6 Nouvelles fonctions de la protéine S..... | 109 |
| 2 Les récepteurs TAM de la protéine S..... | 111 |
| 2.1 Nomenclature | 113 |
| 2.2 Expression | 115 |
| 2.3 Structure et activation..... | 117 |
| 2.4 Signalisation et fonctions cellulaires..... | 119 |
| 3 La protéine S, les récepteurs TAM et le système vasculaire..... | 129 |

Introduction

Chapitre 1 : L’angiogenèse

L’émergence du réseau vasculaire au cours de l’évolution a permis d’approvisionner les organes et les tissus. La diffusion passive de l’oxygène, dans un tissu, étant limitée à 200 µm, l’apparition de la vascularisation a permis le développement d’organismes complexes.¹ La formation de ce système constitue l’un des événements clés au cours du développement embryonnaire et résulte de la succession de deux processus distincts : la vasculogenèse et l’angiogenèse.

- La vasculogenèse correspond à la formation d’un réseau vasculaire primitif à partir de cellules hémangioblastiques dans l’embryon.² Les cellules du mésoderme se différencient en précurseurs des cellules endothéliales (angioblastes) qui prolifèrent et coalescent pour former des ébauches de vaisseaux sanguins primitifs peu ou non fonctionnels à ce stade.^{3,4}

- L’angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux, à partir des vaisseaux préexistants. Le terme angiogenèse a été utilisé pour la première fois en 1787 par le Dr John Hunter (Ouvrage Palmer JF, 1835). Il provient du Grec « angio » pour vaisseaux et « genèse » pour création. L’angiogenèse intervient non seulement lors du développement embryonnaire, mais aussi dans des processus physiologiques (vascularisation mammaire et placentaire) et pathologiques (croissance tumorale, rétinopathie diabétique...) chez l’adulte. Lors de l’embryogenèse, le réseau vasculaire primitif précédemment formé par vasculogenèse est remodelé en réseau vasculaire mature composé de veines, d’artères et de capillaires.⁴⁻⁶ En parallèle à l’angiogenèse et en étroite relation avec celle-ci, un deuxième réseau de vaisseaux se forme, le réseau lymphatique. Cette étape est appelée lymphangiogenèse. Ces deux réseaux physiquement liés sont impliqués dans de nombreuses pathologies, notamment lors de la croissance tumorale et de la dissémination de métastases.^{7,8}

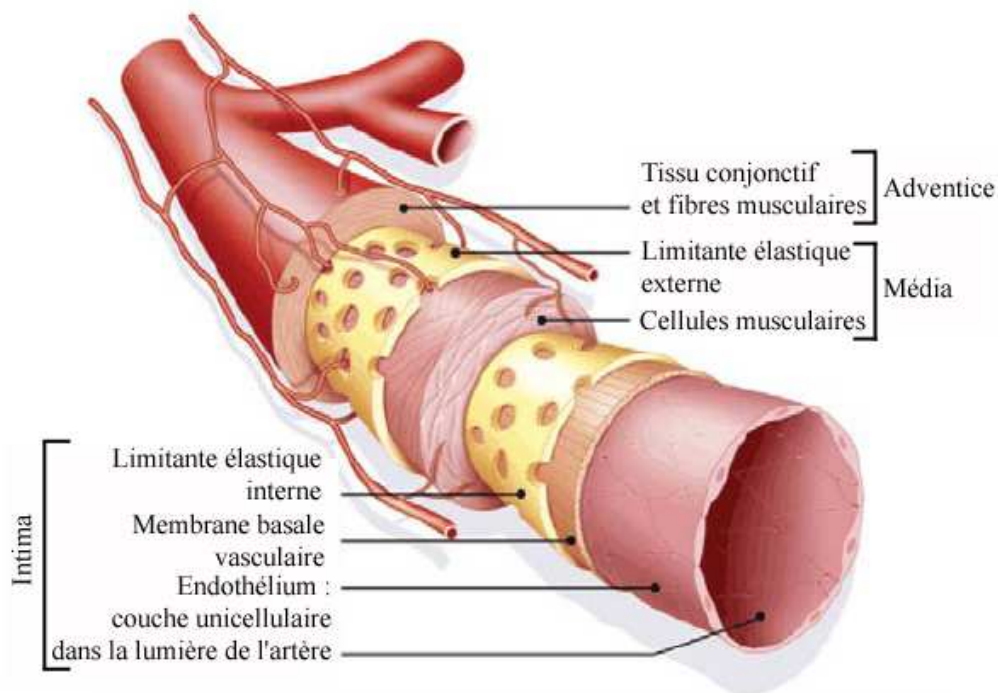


Figure 1 : Schéma de la structure d'une artère

Modifiée d'après Sanofi-Aventis

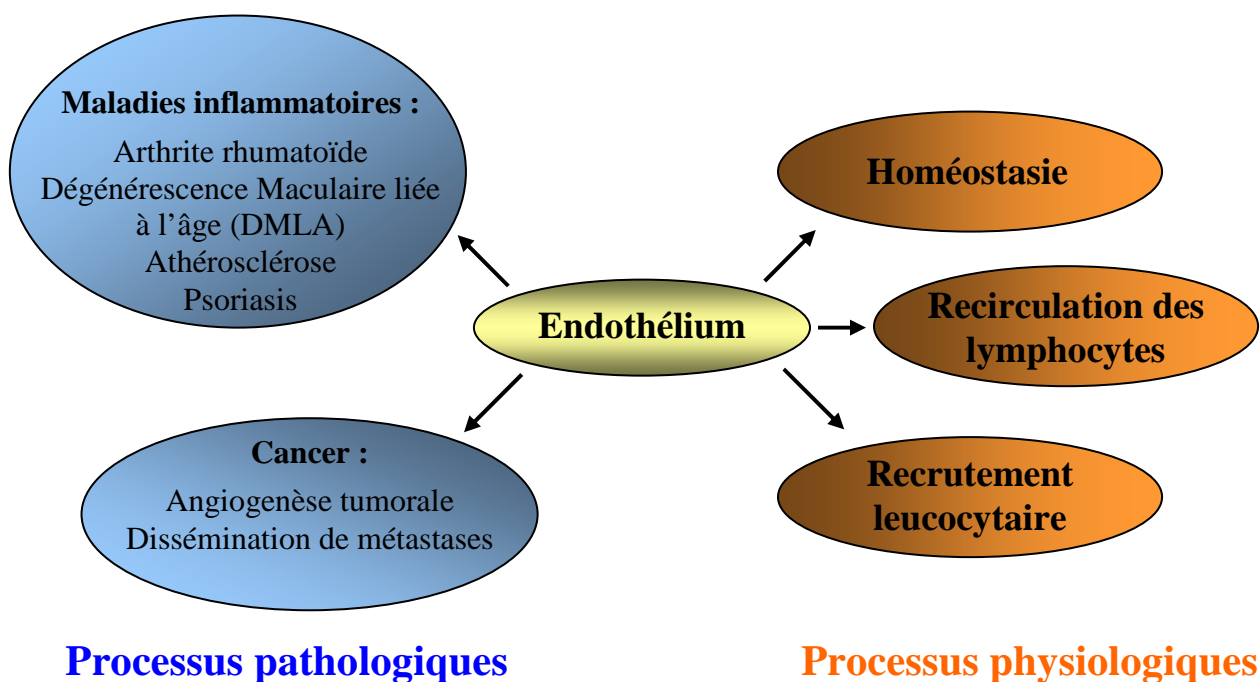


Figure 2 : Implication de l'endothélium dans des processus physiopathologiques

1 L'angiogenèse physiologique

1.1 Structure et fonction du système vasculaire

La principale fonction du système vasculaire est d'assurer la circulation du sang à travers l'organisme via le cœur. Le réseau artériel part du cœur et achemine le sang oxygéné vers les organes et tissus, tandis que le réseau veineux ramène le sang hypoxique vers le cœur. Une fois arrivé au niveau des organes le système artériel se divise en artérioles puis en métartérioles et enfin en capillaires. Le réseau vasculaire est donc composé de trois types de vaisseaux sanguins : les artères et veines, les artérioles et veinules et enfin les capillaires.^{4,9}

1.1.1 Les artères et veines

Les artères et les veines, dont le diamètre de la lumière peut varier de 1 à 2 cm pour les artères élastiques et de 1 mm à 2 cm pour les artères musculaires, sont composées de trois tuniques morphologiquement distinctes de la lumière vers la périphérie : l'intima limitée par la couche interne élastique (LEI), la média limitée par la couche externe élastique (LEE) et l'adventice (figure 1).⁴ L'épaisseur de cette succession de couches cellulaires est de 1 mm pour les artères musculaires à 2 mm pour les artères élastiques.

1.1.1.1 L'intima

L'intima est la couche la plus interne et la plus fine des vaisseaux sanguins. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales, appelée endothélium. Cet endothélium qui repose sur la membrane basale vasculaire est en contact direct avec la circulation sanguine. L'endothélium a longtemps été considéré comme une barrière inerte séparant le sang des organes. Les connaissances actuelles montrent que les cellules endothéliales qui le constituent sécrètent des facteurs autocrines et paracrines importants lors de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques.¹⁰ Du fait de son contact avec la circulation sanguine, l'endothélium vasculaire assure plusieurs fonctions physiologiques mais aussi pathologiques (figure 2) ^{11,12} :

- Barrière physique permettant au sang de conserver sa fluidité, en participant aux trois étapes de l'hémostase : le temps pariétal (composé du temps vasculaire et du temps plaquettaire), le temps plasmatique et le temps thrombodynamique.¹¹
- Barrière perméable permettant les apports d'oxygène, de nutriments aux organes mais aussi l'élimination des déchets pour assurer le bon fonctionnement des organes, ainsi que la

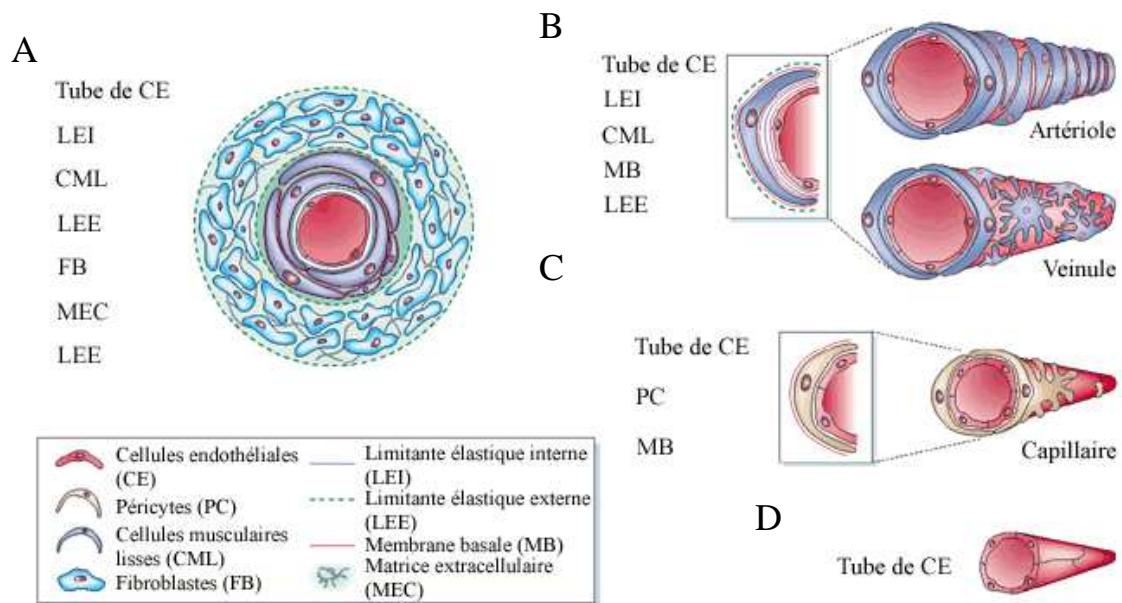


Figure 3 : Structure des différents types de vaisseaux sanguins

Modifiée d'après Jain RK, Nat. Medicine 2003.⁴

- (A) Vaisseau sanguin.
- (B) Artériole ou veinule.
- (C) Capillaire.
- (D) Tube de cellules endothéliales.

pénétration de cellules (immunitaires, inflammatoires ou tumorales) afin d'assurer la défense des organes.¹¹

- Barrière dynamique, permettant l'homéostasie cellulaire ainsi que la formation de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants par angiogenèse.
- Barrière régulatrice permettant de réguler le tonus vasculaire et le flux sanguin par la sécrétion de substances contractiles telles que l'endothéline, ou relaxantes, telles que le monoxyde d'azote (NO), en agissant sur les cellules musculaires de la média sous-jacente.¹¹

1.1.1.2 La média

La média est la couche intermédiaire des artères et des veines. Elle se compose essentiellement de cellules musculaires lisses (figure 1) participant à la contraction ou à la relaxation des vaisseaux sanguins en réponses aux facteurs sécrétés par les cellules endothéliales sous-jacentes et à la régulation du tonus vasculaire.

1.1.1.3 L'adventice

L'adventice est la tunique la plus externe des vaisseaux sanguins. Elle est essentiellement constituée d'une couche de tissu conjonctif peu organisé (collagène IV, laminine) et de fibroblastes assurant l'ancrage du vaisseau dans le tissu (figure 1). La figure 3A montre un exemple de composition d'une artère comparée à celle d'une artériole (figure 3B) et d'un capillaire sanguin (figure 3D).

1.1.2 Les artérioles et veinules

Les artérioles et veinules sont constituées d'une monocouche de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses plus ou moins éparées, implantées dans la lame basale des cellules endothéliales (figure 3B). Le diamètre de leur lumière est d'environ 30 µm et l'épaisseur des couches cellulaires de 20 µm.

1.1.3 Les capillaires

Les capillaires sont les vaisseaux les plus fins du système artériel (le diamètre de leur lumière est de 5 à 8 µm et celui des couches cellulaires de 1 µm). Ils sont constitués uniquement d'une couche de cellules endothéliales recouverte de quelques péricytes associés à la membrane basale vasculaire elle-même composée essentiellement de collagène IV (figure 3C). Lors de la ramification des artérioles et veinules en capillaires, les cellules musculaires lisses qui les composent sont remplacées par les péricytes, qui ont la même origine ontogénique. Les vaisseaux sanguins immatures, formés lors de la vasculogenèse, sont quant à eux uniquement composés d'un tube formé par les cellules endothéliales (figure 3D).

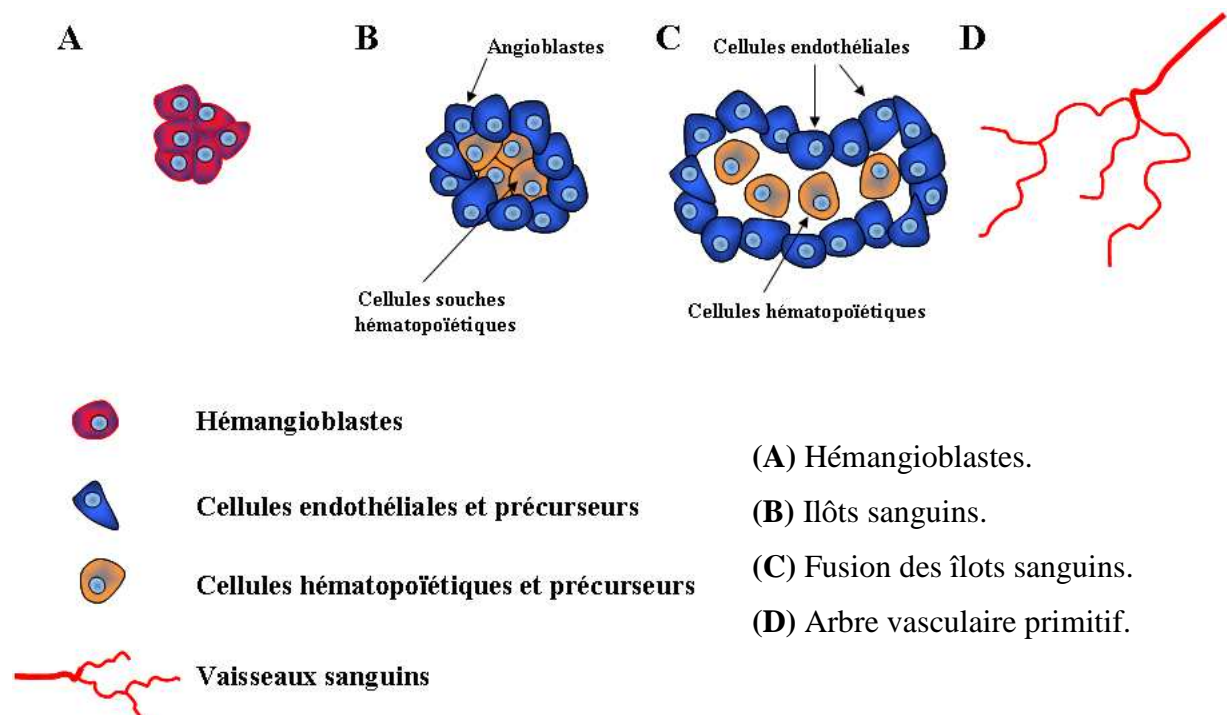


Figure 4 : Vasculogenèse embryonnaire

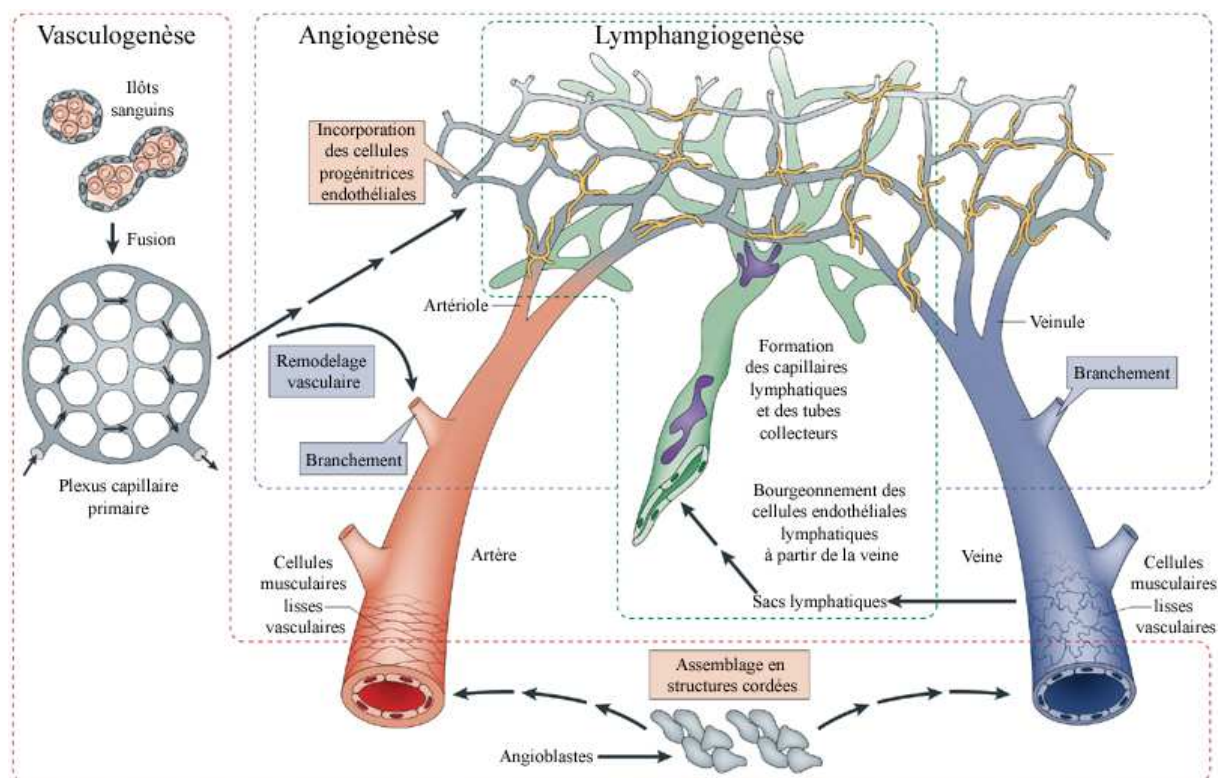


Figure 5 : Formation embryonnaire de l'arbre vasculaire

Modifiée d'après Adams RH et Alitalo K, Nat. Rev. Mol. Cell Biol 2007.¹³

1.2 Formation et développement du système vasculaire

1.2.1 Vasculogenèse ou la formation de l'arbre vasculaire

La vasculogenèse intervient essentiellement au cours du développement embryonnaire. Cette étape correspond à la formation d'un réseau vasculaire primitif à partir de cellules progénitrices endothéliales appelées hémangioblastes et angioblastes, issues du mésoderme.⁶ Les hémangioblastes (figure 4A) se différencient puis s'agrègent formant ainsi des îlots sanguins extra-embryonnaires composés de cellules souches hématopoïétiques au centre et d'angioblastes à leur périphérie (figure 4B). Par la suite, les îlots sanguins ainsi formés fusionnent pour former un plexus capillaire primaire (arbre vasculaire primitif), tandis que les angioblastes se différencient à leur tour en cellules endothéliales (figure 4C) à l'origine de l'endothélium composant tous les vaisseaux sanguins (figure 4D).⁶ Si la vasculogenèse est un phénomène ayant lieu au cours du développement embryonnaire, la présence de cellules progénitrices endothéliales, provenant de la moelle osseuse, dans le sang périphérique a été mise en évidence.¹⁴ Ces observations suggèrent que le phénomène de vasculogenèse pourrait également se produire chez l'adulte notamment lors du processus de néo-vascularisation de certaines tumeurs.¹⁵ Ce phénomène est finement régulé par différents facteurs de croissance dont les plus étudiés sont le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), le Fibroblast Growth Factor (FGF) ou encore le Transforming Growth Factor- β (TGF- β).¹⁶

1.2.2 Angiogenèse ou l'expansion du réseau vasculaire primitif

La croissance de l'embryon nécessite l'expansion et la maturation du réseau vasculaire, à partir du réseau vasculaire primitif préalablement formé par la vasculogenèse (figure 5).¹³ Cette étape d'expansion du réseau à partir de la microcirculation pré-existante est appelée « angiogenèse ». L'angiogenèse est un processus peu fréquent lors de la vie adulte, survenant physiologiquement lors de la réparation tissulaire, la cicatrisation, la gestation (glande mammaire, placenta) et les cycles menstruels féminins (formation du corps jaune).^{17,18} Un dérèglement de l'angiogenèse par défaut ou par excès est à l'origine de nombreuses pathologies telles que des pathologies ischémiques lorsque l'angiogenèse est insuffisante ou des pathologies inflammatoires (arthrite rhumatoïde, psoriasis), des rétinopathies (dégénérescence maculaire liée à l'âge ou DMLA) et la croissance tumorale (figure 2).¹⁹⁻²² Trois types d'angiogenèse ont été décrits : l'angiogenèse par bourgeonnement (« sprouting »), par « intussusception » et par septation (« bridging »).¹⁸

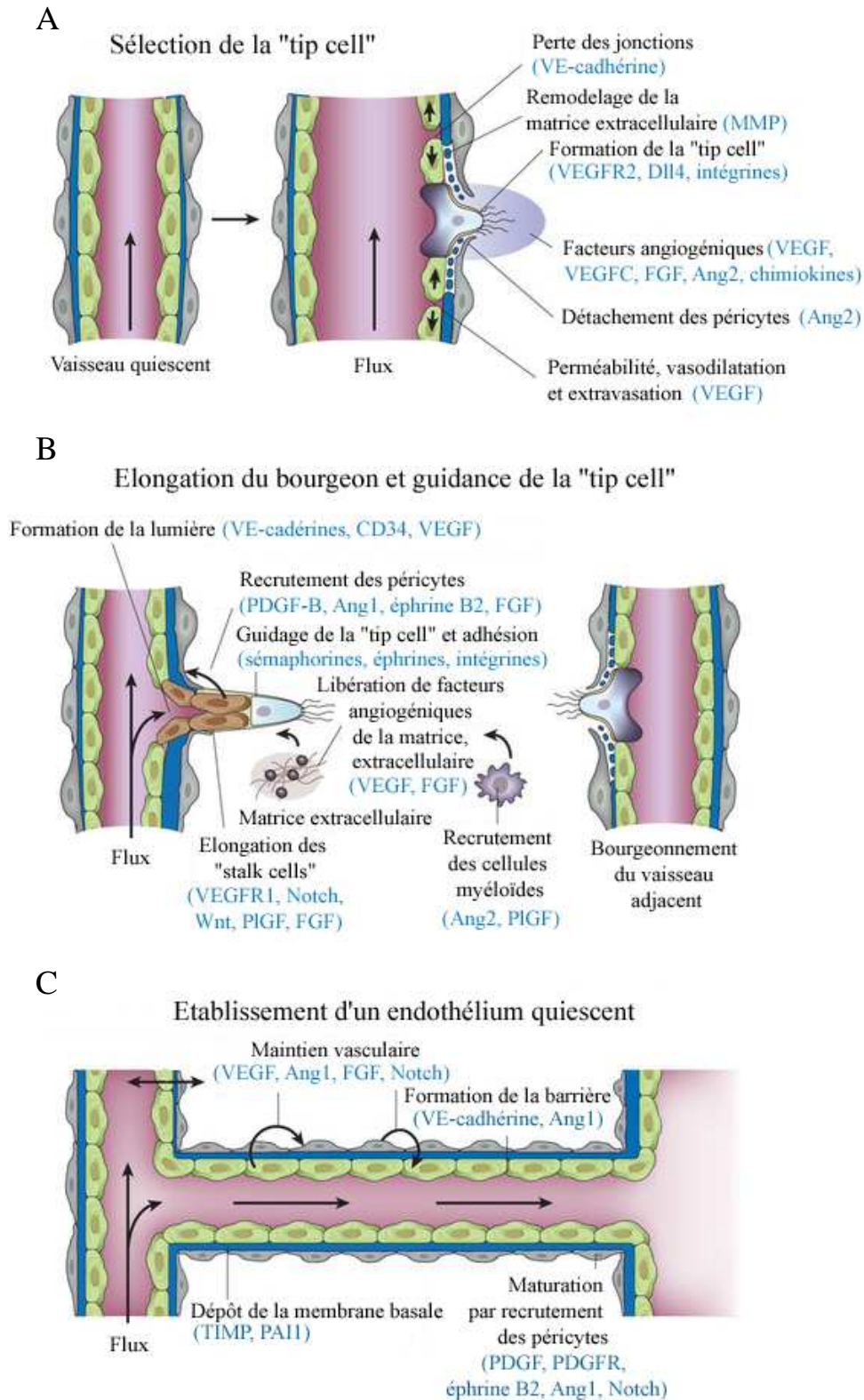


Figure 6 : Les étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement « sprouting »

Modifiée d'après Carmeliet P et Jain RK, Nature 2011.²³

- (A) Phase I de l'angiogenèse par bourgeonnement : sélection de la « tip cell ».
- (B) Phase II de l'angiogenèse par bourgeonnement : élongation du vaisseau sanguin.
- (C) Phase III de l'angiogenèse par bourgeonnement : maturation du vaisseau sanguin.

1.2.2.1 Angiogenèse par bourgeonnement « sprouting »

L'angiogenèse par bourgeonnement est le phénomène le plus courant et le mieux caractérisé. Elle se réalise grâce à la succession de plusieurs étapes suite à un stimulus angiogénique nécessitant l'activation des cellules endothéliales.

- **Dilatation et perméabilité vasculaire :** En condition physiologique, les vaisseaux sanguins sont stabilisés et maintenus grâce à des molécules d'adhérence cellulaire, telles que la cadhérine vasculaire endothéliale (VE-cadhérine), les Platelet-endothelial cell adhesion molecules (PECAMs) mais aussi via la fixation de l'Angiopoïétine-1 (Ang1) sur son récepteur tyrosine kinase (Tie-2) contenant des domaines immunoglobulines et homologues à l'EGF. Dans un premier temps, suite à la stimulation par un ou plusieurs facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGFA, il se produit une déstabilisation de ces différentes interactions induisant la dilatation du vaisseau sanguin (figure 6A). Dans un deuxième temps, la fixation de l'Angiopoïétine-2 (Ang2) sur le récepteur Tie-2 va antagoniser l'effet de l'Ang1, déstabilisant ainsi les contacts intercellulaires endothéliaux et péri-endothéliaux entre les cellules musculaires lisses et les péricytes (figure 6A).²²⁻²⁴

- **Dégradation de la matrice extracellulaire :** Les cellules endothéliales sécrètent ensuite des protéases telles que l'activateur du plasminogène uPA (urokinase type Plasminogen Activator) et des métalloprotéinases matricielles (MMPs) afin de dégrader localement la membrane basale et la matrice extracellulaire (MEC). Cette dégradation est nécessaire à la migration des cellules endothéliales (figure 6A)^{22,23} et permettant également de libérer et d'activer des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et le FGF2 nécessaires à la réalisation d'autres étapes de l'angiogenèse telles que la prolifération et la migration cellulaires.⁴

- **Prolifération et migration des cellules endothéliales :** Les cellules endothéliales proches de la zone de dégradation vont se spécialiser en deux types cellulaires :

- La cellule de la tête apicale ou « tip cell », située à l'extrémité du prolongement capillaire (en bleu sur les figures 6A et B) et spécialisée dans la migration ne prolifère pas. En étendant de longs filopodes elle répond au gradient de concentration des facteurs pro-angiogéniques (VEGFA) afin de migrer en son sens.²⁵

- Les cellules suiveuses basales ou « stalk cell » qui sont des cellules situées à la base du prolongement capillaire (en marron sur la figure 6B), possèdent une forte capacité de prolifération permettant l'extension du capillaire.²⁵

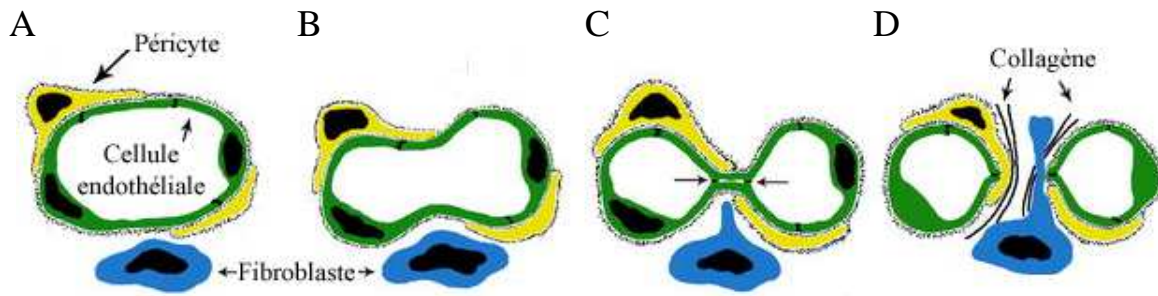


Figure 7 : Les étapes de l'angiogenèse par « intussusception »

Modifiée d'après Djonov V *et al.*, Cell Tissue Res 2003.²⁶

(A) Vaisseau sanguin quiescent.

(B) Phase I de l'angiogenèse par intussusception : invagination de l'endothélium.

(C) Phase II de l'angiogenèse par intussusception : formation d'une séparation entre les cellules endothéliales.

(D) Phase III de l'angiogenèse par intussusception : maturation du vaisseau sanguin.

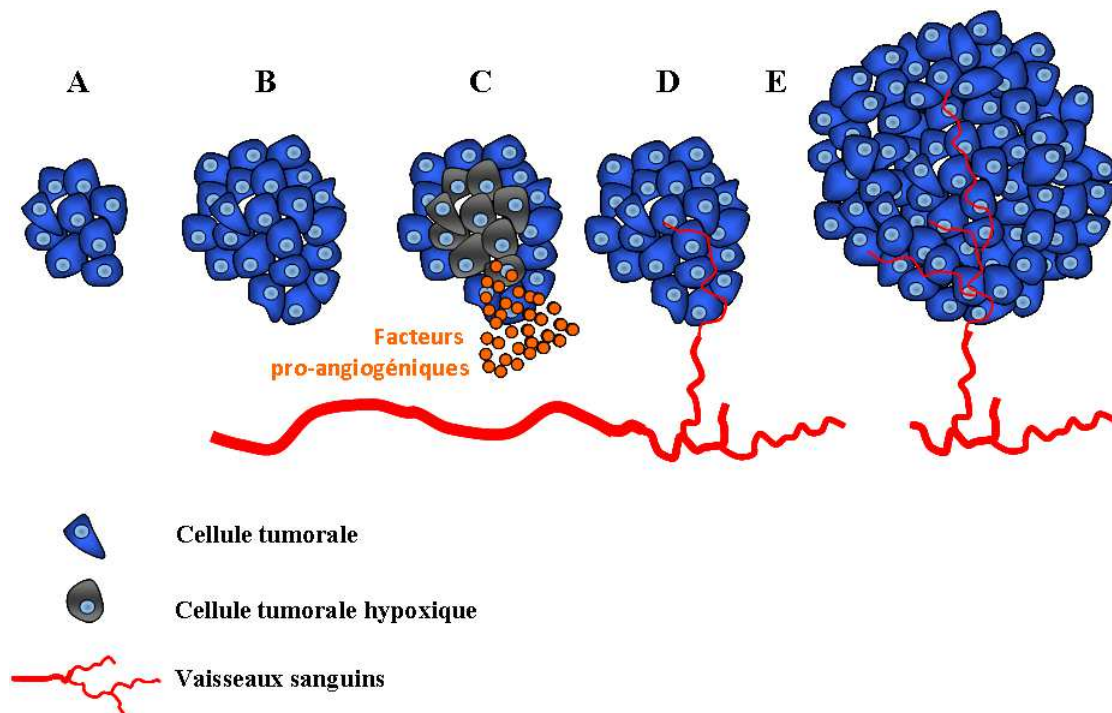


Figure 8 : Les étapes de vascularisation tumorale

(A) Tumeur primaire.

(B) Croissance de la tumeur primaire.

(C) Sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales en condition de stress.

(D) Vascularisation de la tumeur.

(E) Reprise de la croissance tumorale et dissémination de métastases.

La « tip cell » guide donc le vaisseau sanguin en suivant le gradient de facteurs pro-angiogéniques tandis que les « stalk cells » permettent l'élongation de ce dernier. Ce phénomène est fortement régulé par le VEGF,²⁷ le FGF2, le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF),¹⁷ ainsi que par les molécules d'interaction inter-cellulaires ou par les molécules d'interaction avec la matrice extracellulaire telles que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$.^{28,29}

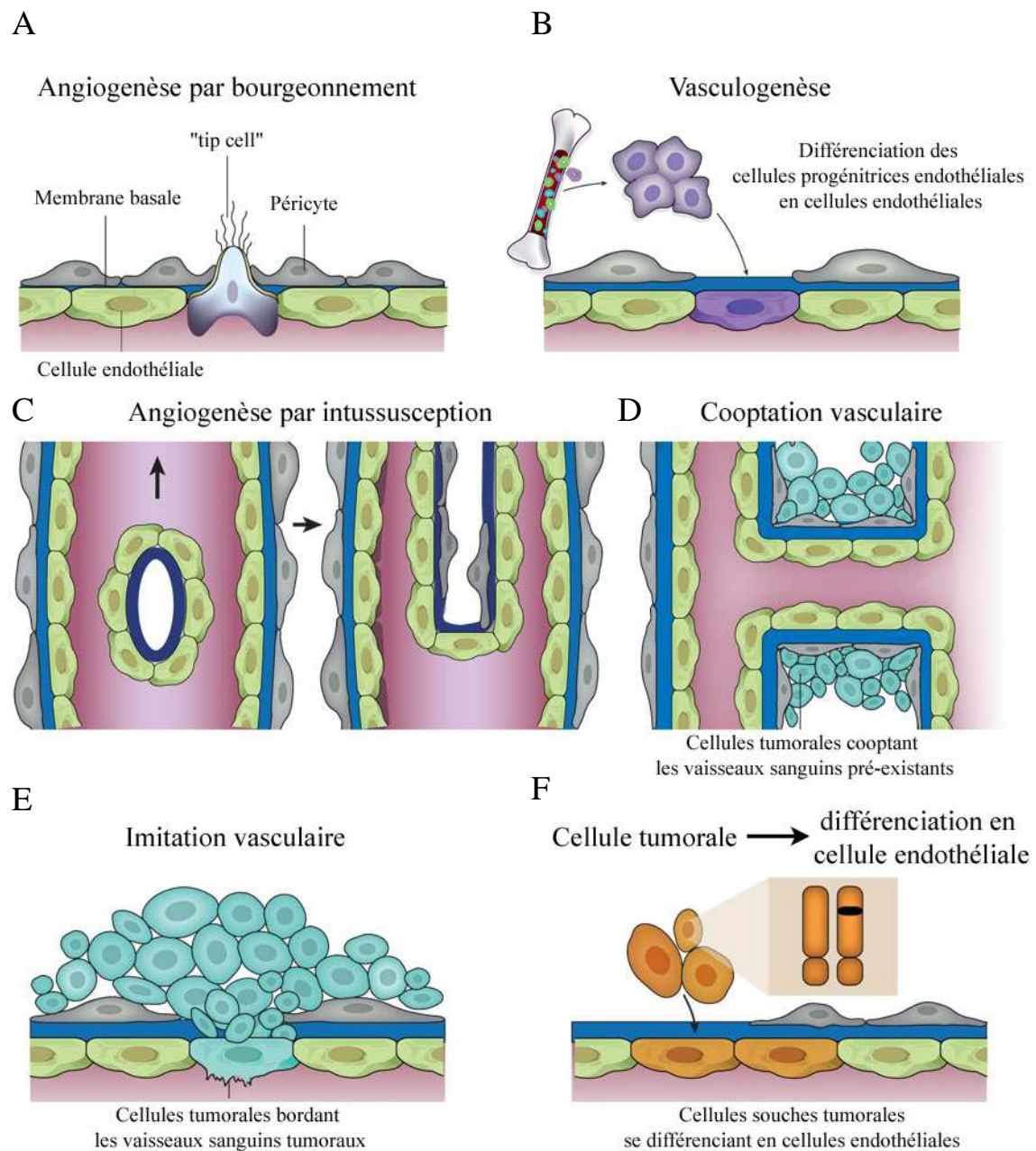
• **Artériogenèse et maturation des néovaisseaux :** Après la migration des cellules endothéliales, s'ensuit une étape de formation du tube endothélial et du lumen régulée par le VEGF en association avec l'Ang1,³⁰ ainsi que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ ²⁸ grâce aux « stalk cells ». ³¹ Puis, le vaisseau sanguin est stabilisé par la production de la matrice extracellulaire, le recrutement de cellules murales (cellules musculaires lisses et péricytes) et la mise en place de jonctions intercellulaires et matricielles (figure 6C).²³ Enfin l'établissement du flux au sein du néovaisseau formé est nécessaire à sa maturation, dans le cas contraire celui-ci est amené à régresser.⁴

1.2.2.2 Angiogenèse par « intussusception »

L'angiogenèse par intussusception correspond à l'élargissement puis à la subdivision d'un vaisseau sanguin pré-existant en deux nouveaux vaisseaux sanguins.³² Ce type d'angiogenèse ne nécessite donc pas l'activation des cellules endothéliales (CE) comme l'angiogenèse bourgeonnante. Le processus débute par l'invagination de l'endothélium dans la lumière du vaisseau sanguin (figures 7A à C). Lorsque deux cellules endothéliales entrent en contact, cela entraîne une réorganisation des jonctions intercellulaires puis la formation d'une séparation entre les cellules endothéliales (figure 7C). Enfin les fibroblastes (FB) et les péricytes (PC) colonisent l'espace intercellulaire et synthétisent la matrice extracellulaire pour stabiliser le vaisseau (figure 7D).²⁶

1.2.2.3 Angiogenèse par septation

L'angiogenèse par septation correspond à la prolifération de cellules endothéliales dans la lumière d'un vaisseau sanguin afin de le cloisonner en deux vaisseaux sanguins bien distincts.¹⁸

**Figure 9 : Les différents types de vascularisation tumorale**Modifiée d'après Carmeliet P et Jain RK, Nature 2011.²³

2 L’angiogenèse tumorale

La croissance tumorale avasculaire est limitée à une taille de 1-2 mm³, l’apport en oxygène et nutriment étant assuré par diffusion simple (figures 8A et B).¹ Au-delà de cette taille, les cellules tumorales se trouvant au centre de la tumeur se retrouvent en hypoxie et en condition de stress métabolique (figure 8C). Dans ces conditions, sous l’influence notamment du facteur de transcription HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α), les cellules tumorales vont sécréter des facteurs pro-angiogéniques, (figure 8C) afin d’induire la vascularisation de la tumeur (figure 8D) et poursuivre ainsi son développement et sa dissémination (figure 8E).³³ De nombreuses études se sont intéressées au ciblage spécifique de l’angiogenèse tumorale afin « d’asphyxier » la tumeur primaire.

2.1 Mécanismes de la vascularisation tumorale

Le principal mécanisme mis en jeu lors de la vascularisation tumorale est l’**angiogenèse par bourgeonnement** (figure 9A), précédemment décrit (paragraphe 1.2.2.1), dont le principal régulateur est le VEGF. Mais ce type d’angiogenèse, même s’il est le plus fréquemment étudié, n’est pas le seul.

2.1.1 Vasculogenèse

Les cellules tumorales peuvent recruter les cellules progénitrices endothéliales issues de la moelle osseuse circulantes chez l’adulte afin de les incorporer aux vaisseaux sanguins tumoraux de manière similaire à ce que nous avons décrit lors de la vasculogenèse embryonnaire (figure 9B).^{34,35} Ce phénomène serait marginal du fait de la faible quantité de cellules progénitrices endothéliales circulantes chez l’adulte.^{14,15}

2.1.2 Angiogenèse par intussusception

Il a également été démontré qu’un vaisseau tumoral préalablement formé est capable de se scinder en deux nouveaux vaisseaux sanguins grâce à l’angiogenèse par intussusception (figure 9C).³⁵ Cependant, l’angiogenèse par intussusception ne peut avoir lieu qu’à partir de vaisseaux sanguins tumoraux pré-existants. Il semblerait donc que le rôle principal de ce type de vascularisation tumorale soit d’augmenter la densité et la complexité du réseau de vaisseaux sanguins tumoraux construit par angiogenèse bourgeonnante. Enfin, les vaisseaux sanguins tumoraux construits de ce fait peuvent servir de point de départ pour une nouvelle étape d’angiogenèse par bourgeonnement.³⁵

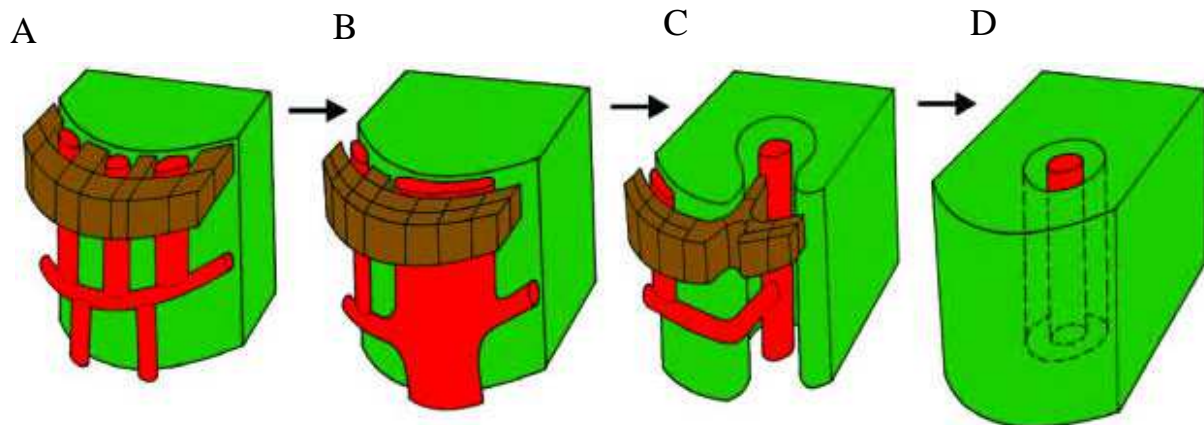


Figure 10 : Vascularisation tumorale par cooptation vasculaire

Modifiée d'après Döme B *et al.*, Am J Pathol 2007.³⁵

(A) Tumeur (en vert) en contact avec un vaisseau sanguin préexistant (en rouge) dans un tissu sain (en marron).

(B) Prolifération tumorale et pression physique sur le vaisseau sanguin préexistant.

(C) Recul du tissu sain au profit de la tumeur.

(D) Englobement du vaisseau sain dans la tumeur.

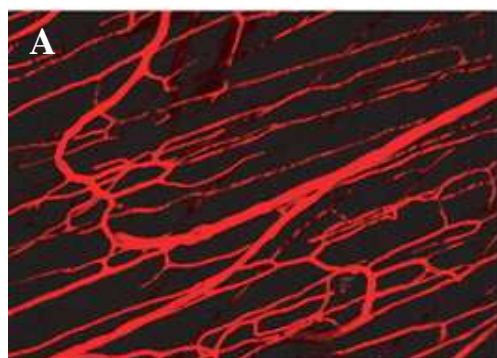


Figure 11 : Morphologie des vaisseaux sanguins normaux et tumoraux

Modifiée d'après Jain RK, Science 2005.³⁶

Images obtenues au microscope photonique de vaisseaux sanguins normaux (A) de vaisseaux sanguins tumoraux (B) issus de xénogreffes de cellules de carcinome de colon humain à des souris.

2.1.3 Cooptation vasculaire

Les cellules cancéreuses, proliférant au contact des vaisseaux sanguins normaux pré-existants (figure 10A), exercent une pression physique sur ce dernier (figure 10B), entraînant le recul de l'organe sain au profit de la tumeur (figure 10C). Le vaisseau sanguin se trouvera alors isolé de l'organe dont il est originaire et incorporé au sein de la tumeur (figures 9D et 10D).^{35,37} Selon les auteurs, ce type de vascularisation reste limité aux premières phases de la croissance tumorale.³⁷ Cependant, des observations morphologiques semblent montrer que ce phénomène persiste lors de la dissémination de métastases cancéreuses.

2.1.4 Imitation vasculaire

Le terme d'imitation vasculaire (« vascular mimicry ») a été précédemment décrit dans une étude comme la capacité de cellules de mélanome à exprimer un phénotype proche des cellules endothéliales afin de former un réseau vasculaire semblable à celui observé chez l'embryon et chez des patients atteints de tumeurs agressives.³⁸ Les cellules tumorales bordant les vaisseaux sanguins expriment certains gènes et certaines protéines associées à de multiples phénotypes cellulaires tels que les cellules endothéliales, les péricytes, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses ainsi que leurs précurseurs. Ces cellules tumorales aux caractéristiques phénotypiques particulières, peuvent alors s'incorporer aux vaisseaux sanguins afin de les allonger (figure 9E).^{35,39-42}

2.1.5 Différenciation des cellules souches tumorales en cellules endothéliales

Des études récentes ont démontré la capacité de cellules souches tumorales de glioblastomes à former un endothélium tumoral en se différenciant en cellules endothéliales (figure 9F).⁴³ Ce phénomène pourrait expliquer la présence observée dans certaines pathologies, de cellules endothéliales dérivées de cellules cancéreuses.⁴⁴

Les tumeurs sont donc capables de détourner le phénomène angiogénique physiologique ou de se différencier en cellules vasculaires afin d'induire leur propre vascularisation. Cependant, ce processus angiogénique dit pathologique est moins finement régulé que le processus physiologique et aboutit à la formation d'une vascularisation tumorale anormale.^{19,36}

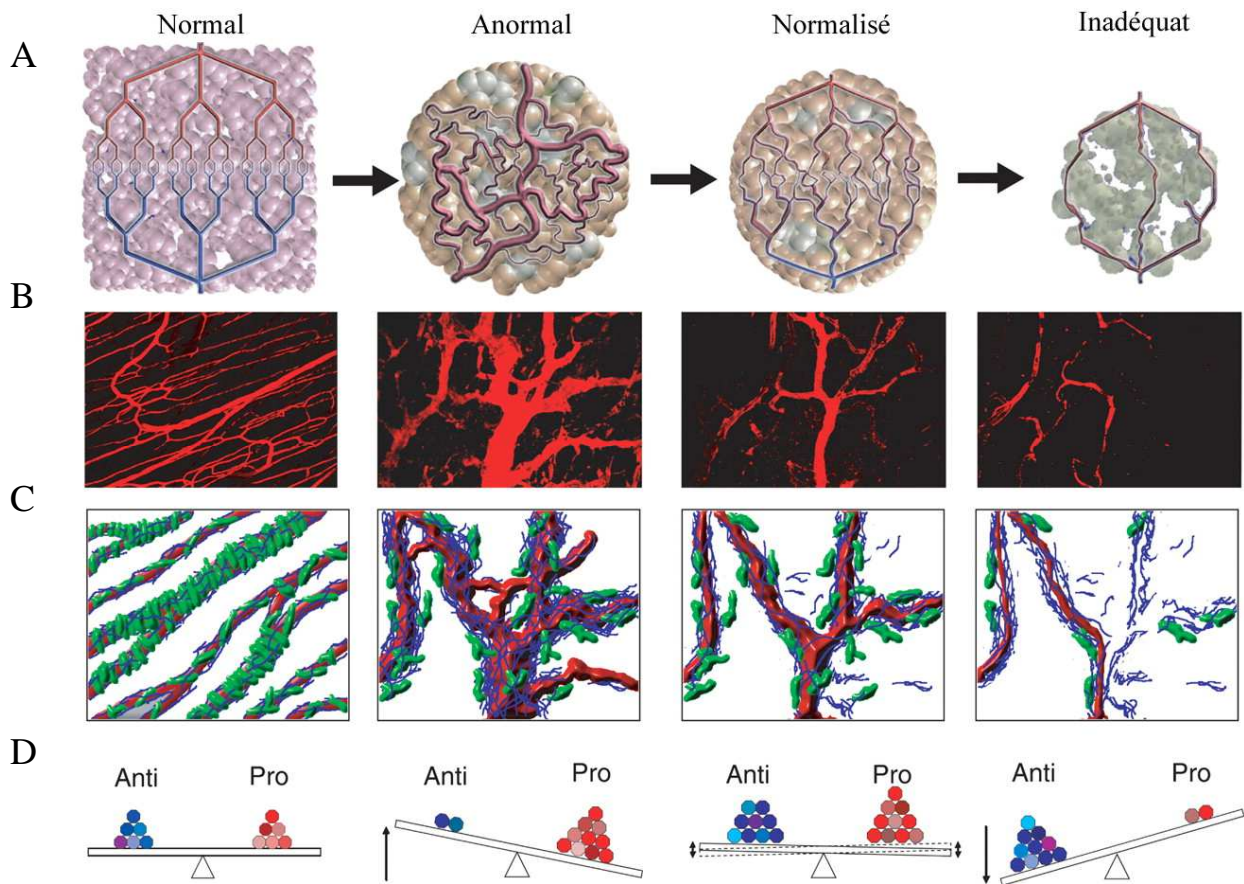


Figure 12 : Concept de commutation « switch » angiogénique et normalisation de la vascularisation tumorale

Modifiée d'après Jain RK, Science 2005.³⁶

(A) Représentation schématique des différents types de vascularisation suivant la position du « switch » angiogénique.

(B) Images obtenues au microscope montrant la morphologie de vaisseaux sanguins selon le type de vascularisation.⁴⁵

(C) Diagramme représentant le recouvrement des vaisseaux sanguins (en rouge) par les péricytes (en vert) et la membrane basale (en bleu) selon le type de vascularisation.

(D) Représentation schématique de la position du « switch » angiogénique suivant la quantité de facteurs pro ou anti-angiogéniques.

2.2 Morphologie des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux tumoraux diffèrent fortement des vaisseaux sanguins normaux d'un point de vue structurel mais aussi fonctionnel.¹⁹ Les vaisseaux sanguins normaux présentent une architecture organisée, régulière et fonctionnelle (figure 11A).

Au contraire, les vaisseaux sanguins tumoraux, parce qu'ils sont faits pour répondre à un besoin important et rapide en nutriments, présentent la particularité d'être sinueux, désorganisés, de diamètre très variable avec de nombreuses ramifications et des fuites hémorragiques (figure 11B).³⁶ Les vaisseaux sanguins tumoraux sont essentiellement des capillaires formés par une monocouche défectueuse non homogène de cellules endothéliales⁴⁶ pouvant être superposées, présentant des jonctions inter-endothéliales lâches (capillaires fenestrés) à l'origine des phénomènes hémorragiques, sans cellules murales de soutien⁴⁵ ou recouvertes de quelques péricytes anormaux.⁴⁷ Comme décrit précédemment, les cellules endothéliales tumorales présentent souvent un phénotype différent des cellules endothéliales.¹⁹ La composition de la membrane basale de ces vaisseaux est normale (collagène IV, laminine etc...) mais d'épaisseur très variable et peut se retrouver non associée aux cellules murales et endothéliales.⁴⁸

L'ensemble de ces anomalies contribue à une perfusion sanguine irrégulière, voir chaotique de la tumeur. Ceci a pour conséquence de créer un cercle vicieux d'angiogenèse en maintenant une hypoxie et une acidification de certaines zones de la tumeur. En effet, celles-ci n'ont pas accès aux nutriments et à l'oxygène nécessaires et par conséquent sécrètent en continue des facteurs pro-angiogéniques.⁴⁹ Cette vascularisation anormale empêche la distribution de molécules thérapeutiques, induisant une résistance de la tumeur à ces traitements.¹⁹ Ces observations ont abouti à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques consistant à normaliser la vascularisation tumorale au moyen de traitements anti-angiogéniques afin de mieux adresser les molécules thérapeutiques au lieu de détruire la tumeur (figure 12).

Cette hypothèse repose sur le concept de commutation ou « switch » angiogénique, qui postule qu'il existe un équilibre physiologique entre les facteurs pro et anti-angiogéniques permettant au réseau vasculaire de rester à un stade quiescent.

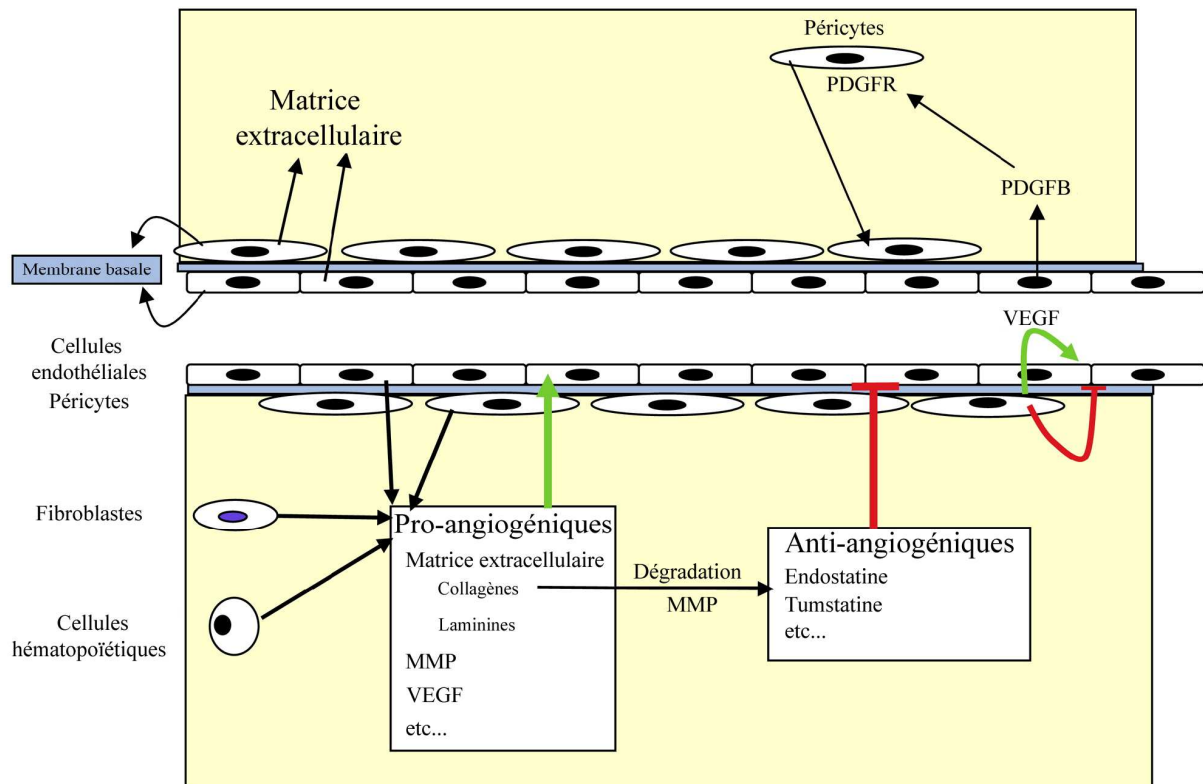


Figure 13 : Influence du micro-environnement endothélial sur la maturation des vaisseaux sanguins

Modifiée d'après Red-Horse K *et al.*, Dev Cell 2007.⁵⁰

2.3 Le concept de commutation ou « switch » angiogénique

Ce concept est apparu en 1971 suite aux observations du Pr. Judah Folkman supposant que la majorité des cellules tumorales sécrètent des facteurs angiogéniques tumoraux qu'il nomme Tumor Angiogenic Factors (TAFs) capables de déclencher l'angiogenèse tumorale.⁵¹ Il postula alors que la croissance tumorale et la dissémination de métastases sont des événements dépendant de cette angiogenèse et que par conséquent une inhibition de celle-ci asphyxierait la tumeur.³³ Il existe ainsi un équilibre naturel entre les agents pro et anti-angiogéniques au cours de la vie adulte maintenant le réseau vasculaire dans un état de quiescence. Le « switch » angiogénique est alors en position « Off » (figures 12A à 12D Normal). Au sein de la tumeur, cet équilibre est perpétuellement perturbé du fait de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques. La rupture de cet équilibre initie l'angiogenèse, le « switch » est alors en position « On » (figures 12A à 12D Anormal).^{23,52} Comme nous l'avons vu précédemment, toutes les zones de la tumeur ne sont pas uniformément vascularisées. Ceci induit une sécrétion constante de facteurs pro-angiogéniques, les vaisseaux sanguins sont donc perpétuellement remodelés afin de répondre aux besoins importants de la tumeur pour sa croissance. Ce « switch » angiogénique peut être déclenché par divers signaux environnementaux ou génétiques. Les signaux environnementaux les plus importants sont le stress métabolique (acidification) et l'hypoxie se produisant notamment au centre de la tumeur où les nutriments et l'oxygène ne peuvent plus arriver par diffusion simple.¹⁹ Le stress mécanique (« Shear stress ») ainsi que la réponse immune et inflammatoire peuvent également participer au processus.¹⁹ Des modifications génétiques telles que l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation d'anti-oncogènes participeraient également à ce phénomène en régulant positivement la production des facteurs pro-angiogéniques et négativement la production de facteurs anti-angiogéniques.⁵³

L'idée de normalisation de la vascularisation tumorale repose donc sur ce concept et postule qu'un traitement par des facteurs anti-angiogéniques permet de ré-équilibrer la balance, c'est-à-dire de retourner à l'état « Off » du switch angiogénique, afin d'obtenir une vascularisation plus organisée et ainsi une meilleure perfusion de la tumeur (figures 12A à 12D Normalisé).^{23,36,54} De manière intéressante, la réversion du switch angiogénique permet non seulement de mieux perfuser la tumeur mais aussi de retrouver des caractéristiques de vaisseaux sanguins tumoraux proches des vaisseaux sanguins normaux, tel qu'une meilleure couverture en cellules murales ou une répartition plus homogène de la membrane basale (MB). Une fois la vascularisation tumorale normalisée, la tumeur recevra plus facilement le

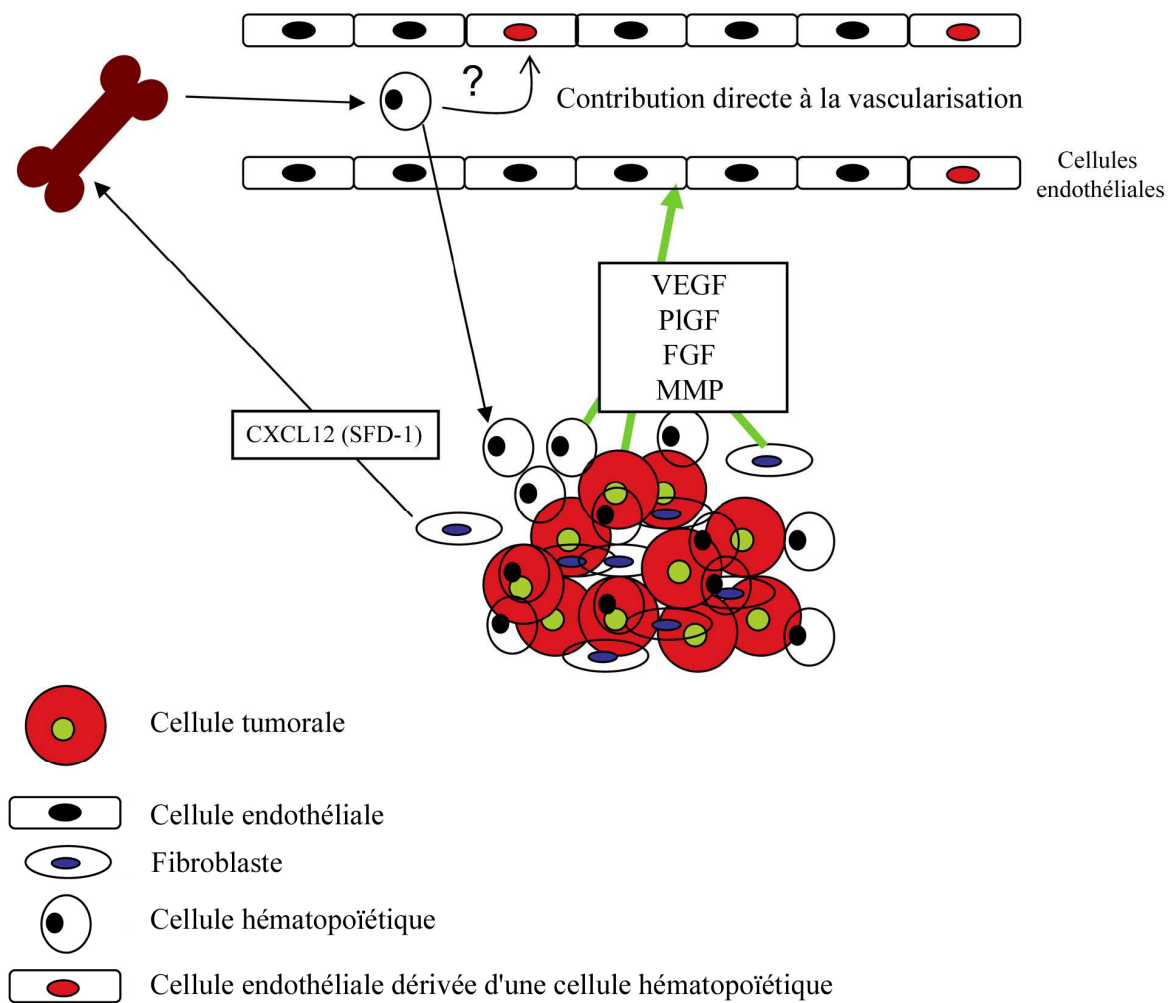


Figure 14 : Contribution du micro-environnement au cours de l'angiogenèse tumorale

Modifiée d'après Red-Horse K *et al.*, Dev Cell 2007.⁵⁰

traitement choisi afin de la détruire (figures 12A à 12D Inadéquat). De plus, il a été démontré que l'absence de vascularisation d'une tumeur induit sa nécrose⁵⁵ ou son apoptose.^{56,57} Enfin, la demi-vie des facteurs anti-angiogéniques étant plus longue que celle des facteurs pro-angiogéniques, l'équilibre penche toujours légèrement en leur faveur.¹⁹

2.4 Micro-environnement tumoral

La nécessité de la mise en place de la vascularisation tumorale est primordiale pour la survie et la croissance de la tumeur primaire.⁵⁵⁻⁵⁷ De nombreuses études mettent en évidence le rôle prépondérant du micro-environnement tumoral dans la tumorigenèse et sa vascularisation. En effet, les multiples interactions entre les cellules endothéliales et leur environnement sont essentielles au cours de la maturation des vaisseaux sanguins (figure 13).⁵⁰

2.4.1 La matrice extracellulaire

La membrane basale, qui sert de support pour les cellules murales telles que les péricytes, sert également de substrat pour la migration des cellules endothéliales et libère des facteurs pro-angiogéniques⁴ tels que le VEGFA et/ou anti-angiogéniques⁵⁸ tels que l'endostatine et la tumstatine⁵⁹ suivant le type de clivage qu'elle subit.⁶⁰

2.4.2 Les cellules murales

Les cellules murales sont recrutées par les cellules endothéliales lors de la maturation des vaisseaux sanguins. La signalisation réciproque au cours de laquelle les cellules murales influencent la fonction des cellules endothéliales a également lieu. Elles renforcent notamment le signal angiogénique en sécrétant du VEGFA afin de stimuler la croissance des cellules endothéliales (figures 13 et 14),^{61,62} à l'inverse des péricytes qui restreignent le signal angiogénique.⁶³ En outre, les péricytes, les cellules musculaires lisses et le mésenchyme avoisinant produisent de l'Ang1, augmentant les interactions inter-endothéliales et entre les cellules endothéliales et les cellules murales, notamment via l'Hepatocyte Growth Factor (HGF).^{30,64,65}

2.4.3 Les cellules hématopoïétiques circulantes

Les cellules hématopoïétiques (CH) influencent fortement la vascularisation tumorale en sécrétant des molécules pro-angiogéniques. Ainsi, les lymphocytes T et B, infiltrant les tumeurs, sécrètent des taux significatifs de VEGF.⁶⁶ Les macrophages associés aux tumeurs jouent également un rôle prépondérant au cours de l'angiogenèse tumorale en produisant eux aussi des facteurs angiogéniques incluant le VEGFA, le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α),

l'Interleukine-6 (IL-6), le FGF2 et la Metalloprotéinase Matricielle-9 (MMP-9). Ces macrophages semblent également avoir la capacité de se différencier en cellules endothéliales afin de s'intégrer aux vaisseaux sanguins (figure 14).⁶⁷

2.4.4 Les fibroblastes

Une étude menée par Dong et coll. a mis en évidence le rôle des fibroblastes au cours de l'angiogenèse et de la progression tumorale.⁶⁸ Grâce à des expériences de xénogreffes de cellules de fibrosarcome n'exprimant pas le VEGF. Cette équipe a mise en évidence la sécrétion d'agents pro-angiogéniques par les fibroblastes (figure 14). De plus, il a été rapporté que les fibroblastes associés aux tumeurs induisent la progression de tumeurs épithéliales alors que les fibroblastes normaux en sont incapables.⁶⁹

2.4.5 Les cellules endothéliales

Alors qu'un grand nombre d'études se sont intéressées aux activités angiogéniques des cellules tumorales, des fibroblastes, des cellules hématopoïétiques, peu d'études se sont intéressées à la manière dont les cellules endothéliales affectent leur environnement. Les cellules endothéliales présentes dans les tumeurs expriment des profils génétiques uniques suggérant qu'elles possèdent des qualités tissulaires spécifiques.⁷⁰ Bandyopadhyay et coll. ont prouvé que les cellules endothéliales peuvent moduler la formation de métastases via l'expression du récepteur membranaire aux chimiokines nommé Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC).⁷¹

Anti-angiogéniques :**Dérivés de la matrice extracellulaire :**

Endostatine
Thrombospondines (TSP)

Facteurs de croissance et cytokines :

Interférons
Interleukines (IL)

Autres :

Angiostatine
TIMPs
Vasostaine

Pro-angiogéniques :**Facteurs de croissances :**

VEGFA
FGF2
Ang1 et 2
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)
Placental Growth Factor (PIGF)

Autres :

TGF- β
TNF- α
MMPs
micro-ARN

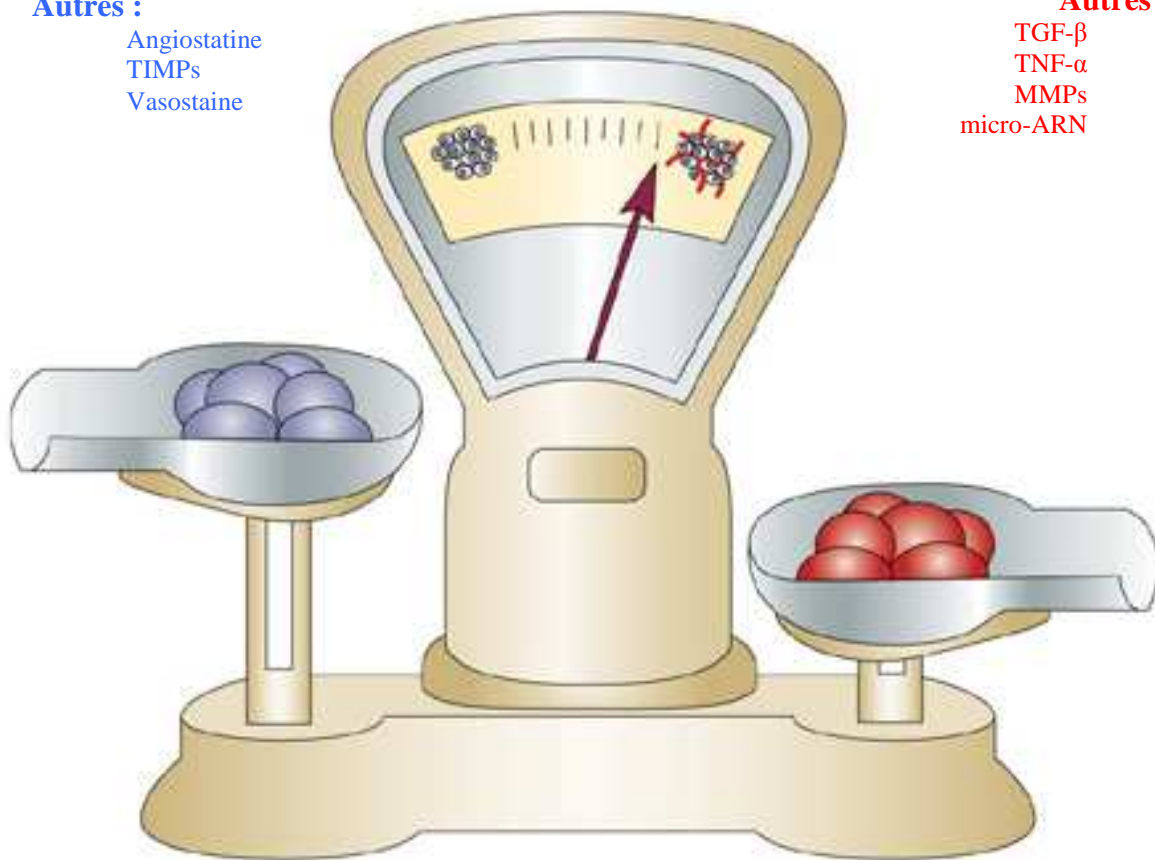


Figure 15 : Représentation schématique non exhaustive des facteurs endogènes impliqués lors du « switch » angiogénique

Modifiée d'après Bergers G et Benjamin LE, Nat Rev Cancer 2003.⁵²

Chapitre 2 : Régulation de l'angiogenèse

Si depuis longtemps les cellules tumorales ont été considérées comme les principales initiatrices du « switch » angiogénique via la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, d'autres types cellulaires tels que les cellules hématopoïétiques, les cellules endothéliales, les cellules murales, ou les protéines de la matrice extracellulaire y participent. Ces facteurs endogènes pro- et anti-angiogéniques (figure 15) sont de différentes natures : facteurs de croissance, cytokines, protéases, ou dérivés du clivage de la matrice extracellulaire.

La plupart des agents anti-angiogéniques endogènes sont des fragments issus de la dégradation de la matrice extracellulaire tels que l'endostatine issu du clivage du collagène XVIII, ou encore les thrombospondines (TSPs) qui sont des glycoprotéines de la matrice extracellulaire. D'autres molécules sont issues du clivage de protéines ayant d'autres fonctions (l'angiostatine est un dérivé du plasminogène), ou sécrétées par des cellules inflammatoires (Interleukines), ou impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire elle-même (thrombospondines).

Les agents pro-angiogéniques sont quant à eux habituellement des facteurs de croissance essentiellement impliqués lors du développement embryonnaire (VEGFA, FGF2, PIFG, PDGF, etc...) mais jouant aussi un rôle physiologique dans l'homéostasie à l'âge adulte. Un système intégré impliquant les angiopoïétines et leur récepteur Tie2 participe à la régulation de la perméabilité vasculaire. Certains facteurs historiquement connus pour leur rôle inducteur de l'angiogenèse peuvent néanmoins exercer des propriétés anti-angiogéniques suivant le contexte : c'est le cas des cytokines TGF- β et TNF- α ainsi que des métalloprotéinases matricielles (MMPs), capables de libérer à partir de la matrice extracellulaire aussi des molécules pro- et anti-angiogéniques. Enfin, récemment une nouvelle classe de molécules influençant l'angiogenèse a été découverte, il s'agit des micro-ARN (miRNA). Leur rôle de régulation de l'expression de certains gènes par dégradation de l'ARN messager leur permet d'exercer principalement des fonctions pro- ou anti-angiogéniques en réponse à un stimulus extracellulaire.

L'objectif de ce chapitre est de détailler le rôle joué par ces différents facteurs pro- ou anti- angiogéniques avant d'aborder les stratégies de traitement envisagées.

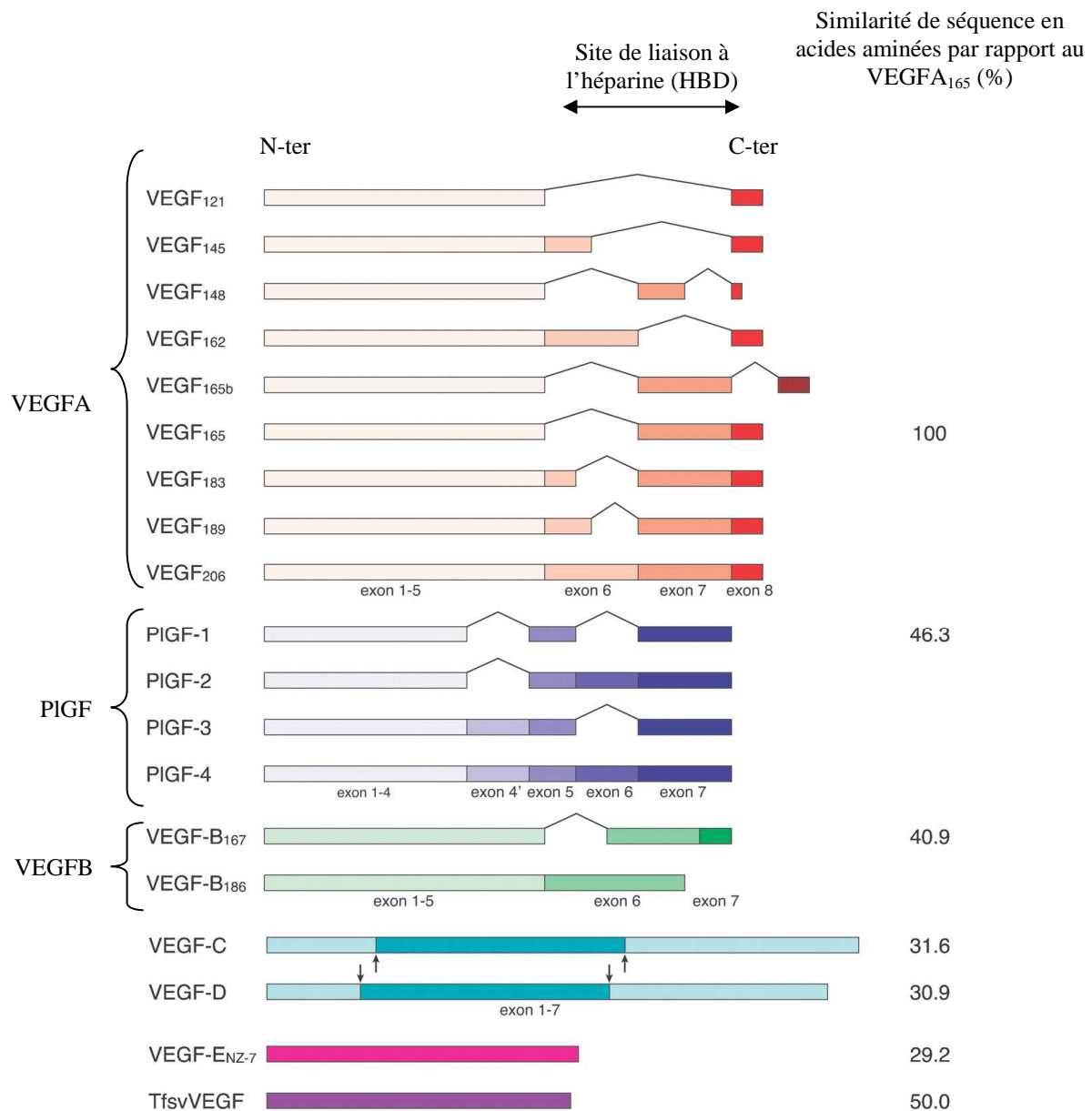


Figure 16 : Structures comparées des membres de la famille du VEGF

Modifiée d'après Takahashi H et Shibuya M, Clin Sci (Lond) 2005.⁷²

→ Les flèches indiquent les sites de clivage par des protéases permettant la maturation du VEGFC et du VEGFD.

1 Les facteurs pro-angiogéniques

1.1 Le VEGF

1.1.1 La famille du VEGF et ses récepteurs

En 1983, Senger et coll. décrivent pour la première fois une protéine capable d'induire une fuite vasculaire dans la peau, à partir du milieu conditionné d'une lignée de cellules tumorales de cochon d'inde. Ils nomment cette protéine « facteur de perméabilité vasculaire » (VPF, tumor Vascular Permeability Factor).⁷³ Ce facteur est par la suite renommé VEGF par Ferrara et coll. En 1989.⁷⁴ De tous les facteurs pro-angiogéniques, la famille des facteurs de croissance VEGF et ses récepteurs à activité tyrosine kinase est la plus étudiée.⁷⁵ Chez l'Homme, cette famille de facteurs de croissance est composée de 5 membres : le VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD et le Placental Growth Factor (PlGF). A ces 5 membres s'ajoutent le VEGF-E identifié chez l'*Orf Virus* (parapoxvirus) et le VEGF-F (ou svVEGF) retrouvé dans le venin de certains serpents (figure 16).⁷² Leur formation en dimères leur confère une activité biologique en se liant avec des spécificités différentes à leurs récepteurs à activité tyrosine kinase appelés VEGF récepteurs (VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3) ainsi qu'à deux récepteurs de faible affinité : les neuropilines 1 et 2 (Nrp1 et Nrp2) (figure 17). Les membres de cette famille sont connus pour leur implication au cours de la vasculogenèse, l'angiogenèse, la lymphangiogenèse et l'hématopoïèse.⁷⁶

• **VEGFA** : C'est le facteur de croissance considéré comme le principal médiateur des processus de vasculogenèse et d'angiogenèse physiologiques ou pathologiques.⁷⁶ C'est en 1989 que Ferrara et coll. ainsi que Plouet et coll. isolent un facteur mitogène pour les cellules endothéliales à partir du surnageant de cellules de la glande pituitaire bovine.^{74,77} Le VEGFA se rencontre au moins sous 14 isoformes de 121 à 206 kDa (VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF_{121b}, VEGF₁₄₅, VEGF_{145b}, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₃, VEGF_{183b}, VEGF₁₈₉, VEGF_{189b}, et VEGF₂₀₆)⁷⁸ obtenues par épissage alternatif, qui se différencient par leur extrémité C-terminale (Figure 16). Sa forme la plus courante est le VEGFA₁₆₅.⁷⁹⁻⁸¹ En se liant de manière préférentielle au VEGFR1 et au VEGFR2^{72,76,82} il induit l'angiogenèse (figure 17), mais n'a aucune affinité pour le VEGFR3.⁸³ De plus, via son domaine C-terminal, il peut également se lier aux Nrp 1 et Nrp 2 qui agissent comme des corécepteurs (figure 17). La fixation de l'héparine sur son domaine de liaison appelé HBD (Heparin Bindin Domain) situé au niveau de l'extrémité C-terminale du VEGFA stabilise la liaison du VEGFA sur l'un de ses récepteurs.^{84,85} Ce facteur sera plus amplement décrit par la suite.

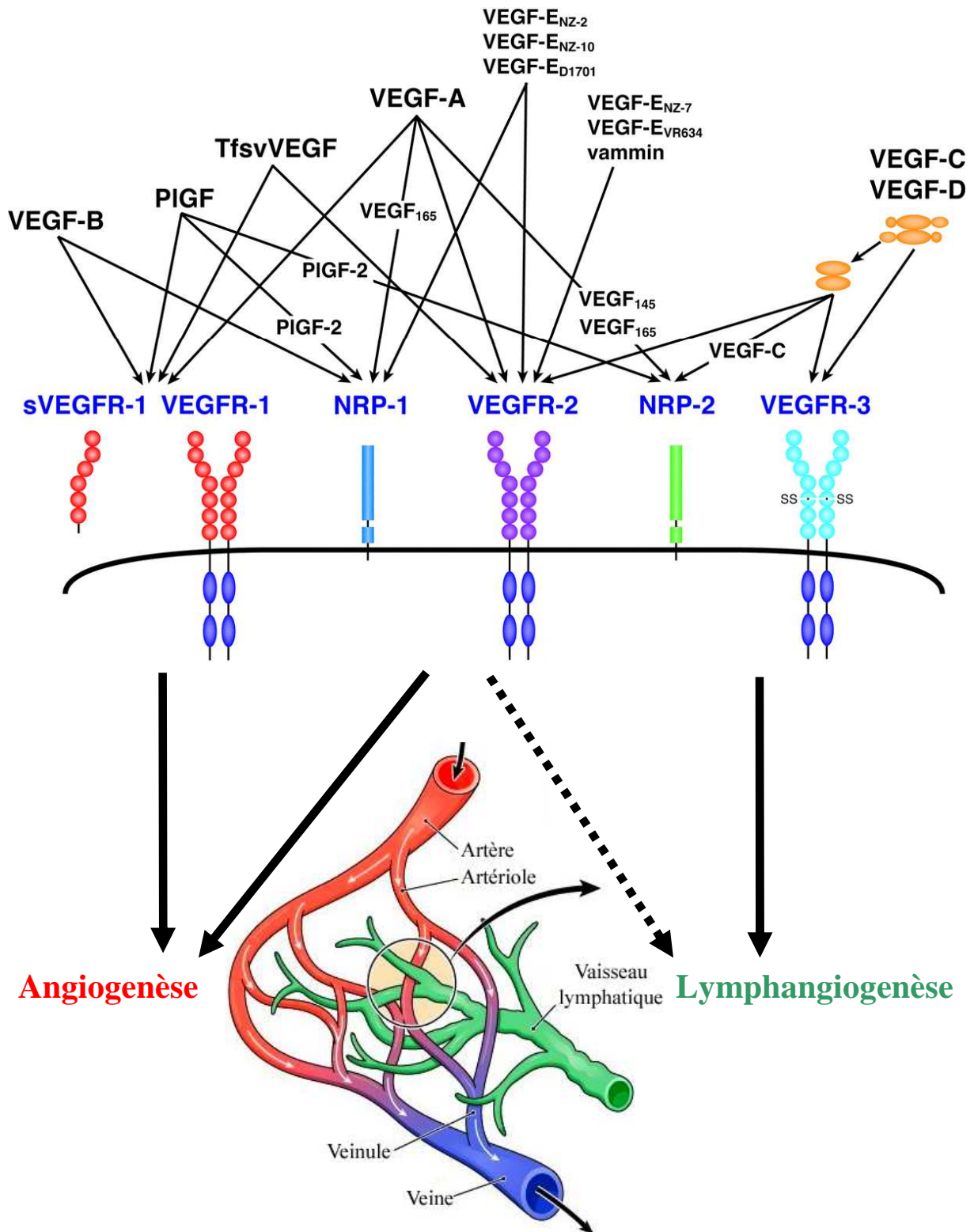


Figure 17 : Les membres de la famille du VEGF et leurs récepteurs

Modifiée d'après Takahashi H et Shibuya M, Clin Sci (Lond) 2005.⁷²

• **VEGFB** : Chez l'Homme, il existe sous deux isoformes, le VEGFB₁₆₇ et le VEGFB₁₈₆, générées par épissage alternatif (figure 16). Il est largement exprimé dans l'ensemble des tissus, mais son expression est plus importante dans le cœur et dans le muscle squelettique.⁸⁶ La délétion du gène du VEGFB chez la souris n'influence pas l'angiogenèse mais la formation du système cardiovasculaire embryonnaire. Ces animaux ont un cœur plus petit, un dysfonctionnement de la vascularisation coronarienne et ne se rétablissent pas après induction d'une ischémie cardiaque.⁸⁷ De plus, Mould et coll. ont démontré que la surexpression du VEGFB potentialise la croissance des vaisseaux sanguins *in vitro* et *in vivo*.⁸⁸ Ce facteur ne se lierait pour sa part qu'au VEGFR1 et à la Nrp 1 (figure 17).

• **VEGFC et D** : Ces facteurs ont en commun des séquences N- et C-terminales uniques dans la famille des membres du VEGF, assurant leur maturation par protéolyse (figure 16).⁸⁹ Ils sont principalement impliqués lors de la lymphangiogenèse en se liant au récepteur VEGFR3,⁹⁰⁻⁹³ mais peuvent aussi induire la prolifération des cellules endothéliales en activant le VEGFR2 après avoir été clivés en formes plus courtes (figure 17).^{94,95}

• **VEGFE (VEGFEnz-7)** : Toutes les formes de ce variant du VEGF identifiées chez un virus de la famille des Poxviridae (*Orf Virus*) se lient et activent le VEGFR2, mais pas le VEGFR1 et le VEGFR3 (figures 16 et 17).⁷² Les souris transgéniques surexprimant le VEGFEnz-7 présentent une augmentation de l'angiogenèse des tissus sous-cutanés.⁹⁶

• **VEGFF (svVEGF)** : Ces variants du VEGF isolés à partir du venin de vipères *Bothrops insularis*⁹⁷ (figure 16) accentuent les effets du venin chez les victimes de morsures.⁷² L'isoforme *Trimeresurus flavoviridis* svVEGF (TfsvVEGF) se lie avec une forte affinité pour le VEGFR1 et une faible affinité pour le VEGFR2 comparativement au VEGFA₁₆₅ (figure 17), induisant ainsi une forte augmentation de la perméabilité vasculaire mais une faible augmentation de la prolifération cellulaire.⁹⁸

• **PIGF** : Le facteur de croissance placentaire (Placental Growth Factor, PIGF) a été découvert par clonage dans une banque d'ADNc de placenta humain. Il existe 4 isoformes de PIGF (figure 16).⁹⁹ La délétion du gène codant pour le PIGF (*Pgf*^{-/-}) n'altère pas le développement vasculaire embryonnaire chez la souris.¹⁰⁰ En revanche, le PIGF semble stimuler l'angiogenèse en déplaçant la liaison du VEGFA au VEGFR1 vers le VEGFR2 (figure 17).¹⁰¹ De plus, le PIGF stimule l'angiogenèse en activant le VEGFR1.^{102,103} Ce rôle pro-angiogénique suscite quelques controverses. En effet, il a été démontré que le PIGF-1 antagonise la croissance tumorale et l'angiogenèse induites par le VEGFA en formant des hétérodimères non fonctionnels avec le VEGFA.^{104,105}

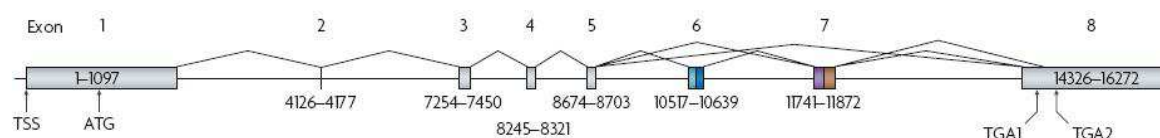


Figure 18 : Structure du gène du VEGFA

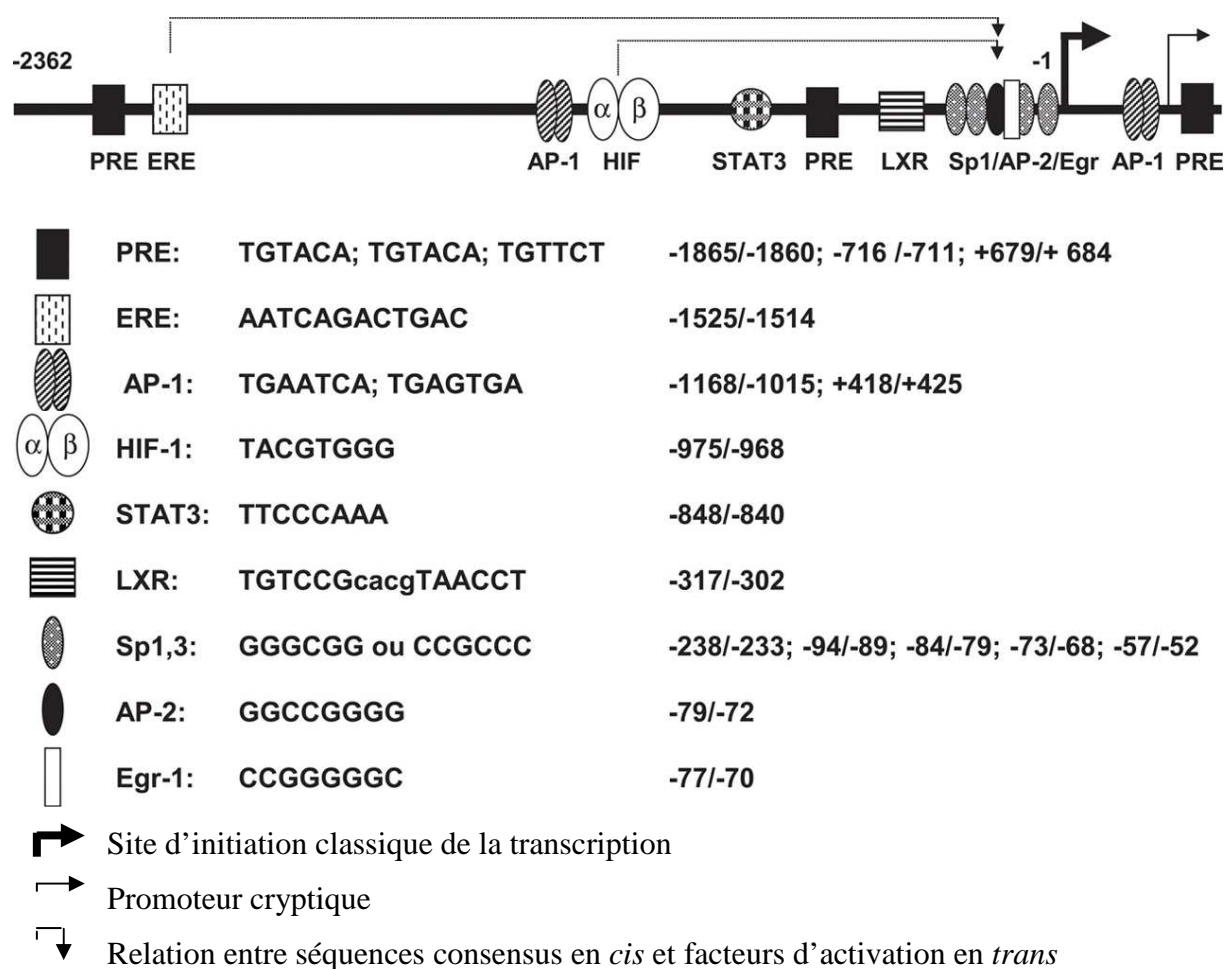
Modifiée d'après Harper SJ et Bates DO, Nat Rev Cancer 2008.¹⁰⁶

Figure 19 : Structure du promoteur du gène du VEGFA

Modifiée d'après Pages G et Pouyssegur J, Cardiovasc Res 2005.¹⁰⁷

1.1.2 Gène, synthèse et régulation

Chez l'Homme, le gène codant pour le VEGFA est situé sur la deuxième bande de la région 1 des bras courts du chromosome 6 (6p12), il mesure 16 272 paires de bases (pb) et se compose de 8 exons séparés par 7 introns (figure 18).^{106,108} Sa transcription se fait dans un premier temps sous forme de pré-ARNm puis subit différents épissages alternatifs des exons 6 et 7 codants pour le domaine de liaison à l'héparine afin de donner 14 isoformes d'ARNm connues à ce jour codant chacune pour une isoforme protéique du VEGFA (figure 16). La dénomination des isoformes du VEGF reflète le nombre d'acides aminés contenus dans la protéine. Les principales isoformes sont le VEGF₁₂₁, le VEGF₁₆₅ et le VEGF₁₈₉.⁷⁸

• **Régulation transcriptionnelle du VEGFA :** L'expression du gène du VEGFA est régulée par diverses conditions environnementales : l'hypoxie, le stress métabolique, la diminution du pH, des cytokines inflammatoires tel que l'IL-6, des facteurs de croissance tel que le FGF2, des hormones telles que les œstrogènes et les androgènes et certaines chimiokines.¹⁰⁹ Le promoteur du VEGFA contient un grand nombre de sites consensus pour :

➤ Les facteurs de transcription tels que Specificity Protein 1 et 3 (Sp1/Sp3), Activator Protein-2 (AP-2), Early gene response protein-1 (Egr-1), Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (STAT-3) et HIF-1

➤ La fixation des récepteurs aux œstrogènes : Estrogen Receptor Element (ERE) et à la progestérone : Progesterone Response Element (PRE)

➤ La fixation aux récepteurs aux oxystérols : Liver X Receptor (LXR).¹⁰⁷

La présence d'un promoteur cryptique situé dans la région 5' non codante (+632 pb en amont du site d'initiation de la transcription classique) insensible à l'hypoxie¹¹⁰ conjugué à l'absence de séquence consensus TATA box démontrent que ce gène est finement régulé de manière non conventionnelle (figure 19).¹⁰⁷ Outre cette régulation par les facteurs de transcription, l'expression du VEGFA est induite par l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille Epidermal Growth Factor (EGF),¹¹¹ insuline,¹¹² Insulin-like Growth Factor (IGF),¹¹³ Hepatocyte Growth Factor (HGF),¹¹⁴ PDGF¹¹⁵ et FGF,¹¹⁶ via les voies de signalisation des Mitogen-Activated Protein-Kinases (MAP-Kinases) ainsi que de la Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt.

• **Régulation post-transcriptionnelle du VEGFA :** Celle-ci se fait principalement grâce à deux mécanismes distincts : la stabilisation ARNm du VEGFA et l'épissage alternatif de son pré-ARNm. Les éléments riches en AU (appelé ARE ou AU Rich Element) identifiés

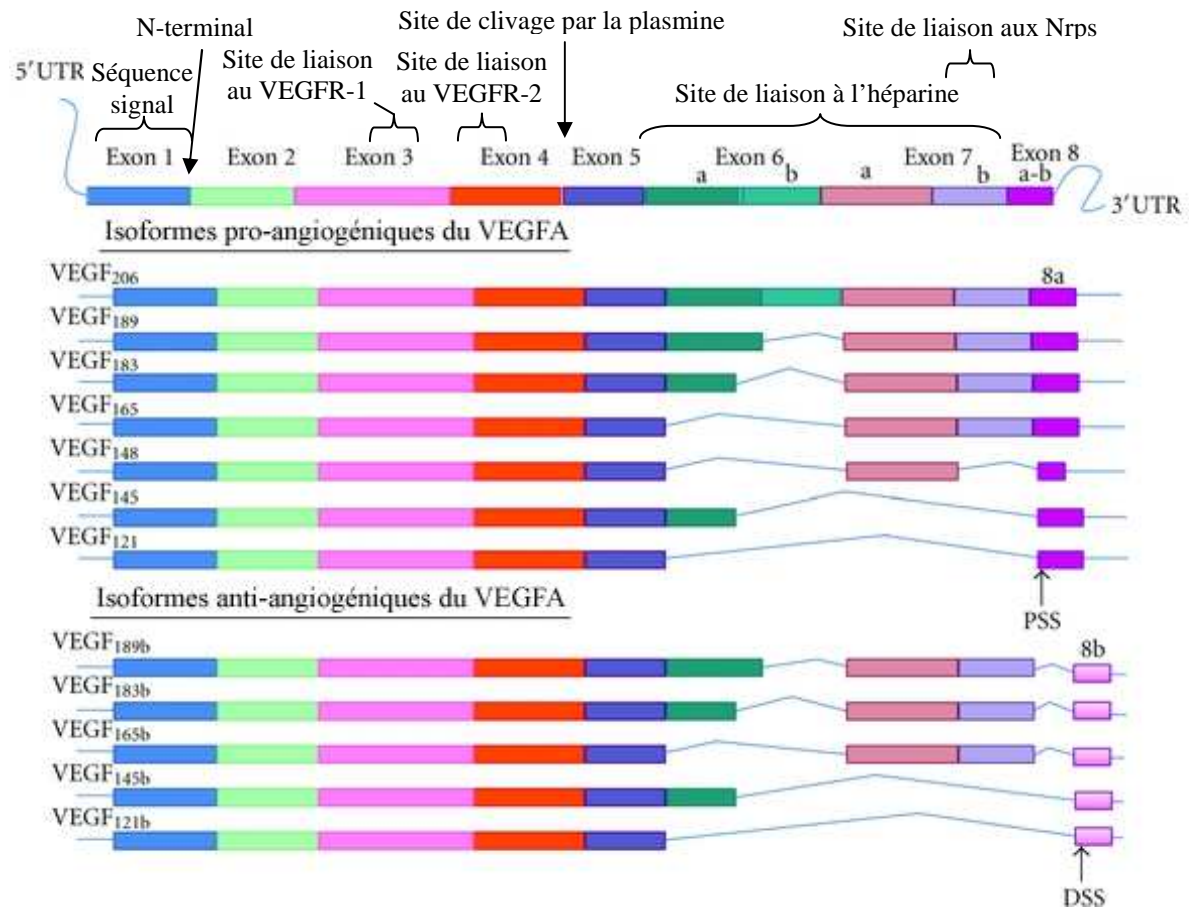


Figure 20 : Les différentes isoformes de pré-ARNm du VEGFA

Modifiée d'après Hilmi C *et al.*, J Nucleic Acids 2012.¹¹⁷

Les isoformes VEGFA₁₁₁ et VEGFA₁₆₂ ne sont pas représentées sur cette figure.

dans la région 3'-Untranslated region (3'-UTR) de l'ARNm participent à sa régulation. En effet, les domaines ARE constituent des sites de fixation sur l'ARNm pour des protéines stabilisatrices et/ou déstabilisatrices de l'ARNm.¹¹⁸ Parmi les protéines déstabilisatrices, on retrouve le A+U-rich element binding Factor 1 (AUF1) ou encore les protéines de la famille Tetra-décanoyl Phorbol Acetate-induced-sequence-11 (TIS11) dont le rôle de déstabilisation sur l'ARNm du VEGFA a été démontré.¹¹⁹ La protéine RNA-binding protein human antigen R (HuR) permet quant à elle la stabilisation de l'ARNm du VEGFA.¹²⁰

L'épissage alternatif des 8 exons composant le pré-ARNm du VEGFA permet de générer l'ensemble des 14 isoformes de ce dernier, découvertes à ce jour (figure 20). Ce mécanisme permet la synthèse des isoformes majeures pro-angiogéniques du VEGFA (VEGFA₁₆₅, VEGFA₁₈₉ et VEGFA₁₂₁), mais aussi des isoformes mineures (VEGFA₂₀₆, VEGFA₁₈₃, VEGFA₁₄₅, VEGFA₁₄₈ et VEGFA₁₁₁) dont la fonction reste indéterminée, ainsi que d'isoformes anti-angiogéniques (VEGFA_{189b}, VEGFA_{183b}, VEGFA_{165b}, VEGFA_{145b} et VEGFA_{121b}) (figure 20).¹¹⁷ Comme nous l'avons précédemment abordé, certaines de ces isoformes peuvent être libérées de la matrice extracellulaire par protéolyse de leur partie C-terminale. La partie biologiquement active du VEGFA correspondant aux 110 acides aminés terminaux¹²¹, cela suggère que les isoformes courtes du VEGFA (VEGFA₁₂₁ et VEGFA₁₆₅) seraient sécrétées tandis que les isoformes longues (VEGFA₁₈₉ et VEGFA₂₀₆) seraient associées à la matrice extracellulaire.

• **Régulation traductionnelle du VEGFA :** Une autre isoforme du VEGFA a été découverte par Huez et Coll. en 2001, il s'agit du Large-VEGF (L-VEGF). Néanmoins, cette isoforme n'est pas due à un épissage alternatif mais à la traduction d'un codon d'initiation CUG en lieu et place du codon ATG habituel situé en amont de celui-ci.¹²² Le L-VEGF possède 206 acides aminés de plus que le VEGF dont la traduction a été initiée par le codon ATG. Il peut générer un fragment N-terminal de 206 acides aminés séquestré dans l'appareil de golgi et un fragment C-terminal sécrété par la cellule correspondant au VEGF dont la traduction a été initiée par le codon ATG par clivage protéolytique au cours de modifications post-traductionnelles.¹²²

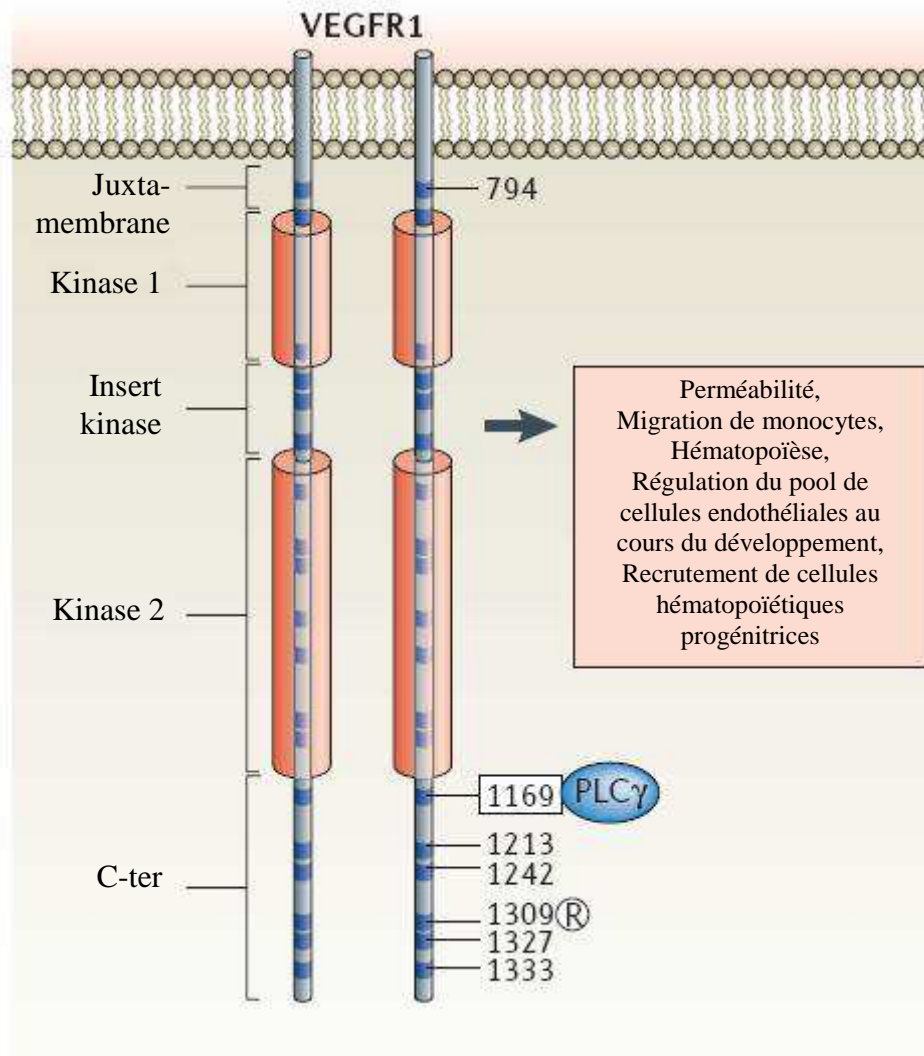


Figure 21 : Structure et effets cellulaires du VEGFR1

Modifiée d'après Olsson AK *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol 2006.⁸¹

1.1.3 Signalisation induite par le VEGFA

Le VEGFA est capable de se lier via deux domaines distincts (figure 20) et d'activer deux de ses récepteurs à activité tyrosine kinase : le VEGFR1 et le VEGFR2 (figure 17). Ces récepteurs sont formés de deux domaines extracellulaires de 750 acides aminés organisés en 7 domaines Immunoglobulin (Ig)-like. Cette partie extracellulaire N-terminale est suivie d'une région transmembranaire, d'un domaine juxtaposé à la membrane, de deux domaines à activité tyrosine-kinase interrompus par un insert à activité kinase de 70 acides aminés, et se termine par une extrémité C-terminale (figure 21).^{82,83} La fixation d'un homo ou d'un hétérodimère de VEGF entraîne la dimérisation homologue ou hétérologue de VEGFRs puis l'activation de leur domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. Une fois activés les VEGFRs phosphorylent par rétro-contrôle des résidus particuliers de leur domaine intracellulaire servant de point d'ancrage à des protéines contenant des domaines d'homologie avec Src (SH2 domains). Il existe une forme soluble du VEGFR1.

• **Signalisation induite par le VEGFR1** : La délétion du gène codant pour le VEGFR1 induit la mort de l'embryon chez la souris entre les jours 8.5 et 9.0 à cause d'une croissance exponentielle des cellules endothéliales et une désorganisation des vaisseaux sanguins.¹²³ Ces observations suggèrent que le VEGFR1 agit comme un inhibiteur du développement du système vasculaire durant l'embryogenèse. A l'inverse, des études ont montré que l'activité tyrosine kinase du VEGFR1 serait nécessaire à la migration des cellules hématopoïétiques induite par le VEGFA¹²⁴ et à l'infiltration de monocytes/macrophages dans les tumeurs.¹²⁵ Malgré sa forte affinité pour le VEGFA ($K_d = 10$ pM), soit une affinité dix fois supérieure à celle du VEGFR2, ses propriétés de transduction du signal sont faibles (augmentation du taux de phosphorylation du VEGFR1 de seulement deux fois).⁸³ Parmi les différents résidus tyrosines constituant des sites d'autophosphorylation pour le VEGFR1 (figure 21), le site Tyr¹¹⁶⁹ a une importance toute particulière. En effet, la phosphorylation de ce site permet le recrutement de la phospholipase C- γ (PLC γ). Malgré sa forte affinité pour le VEGFA, son implication dans diverses voies de signalisation et son rôle lors de l'activité des cellules endothéliales semblent limités.¹²⁶ Ainsi, le VEGFR1 pourrait piéger le VEGFA prévenant l'activation de son homologue VEGFR2 par le VEGFA. En effet, Carmeliet et coll. ont démontré qu'il existe une synergie entre les ligands du VEGFR1 et du VEGFR2, indiquant des interférences entre ces récepteurs capables de moduler une large variété de signaux intracellulaires médiés par ces derniers.¹⁰⁰

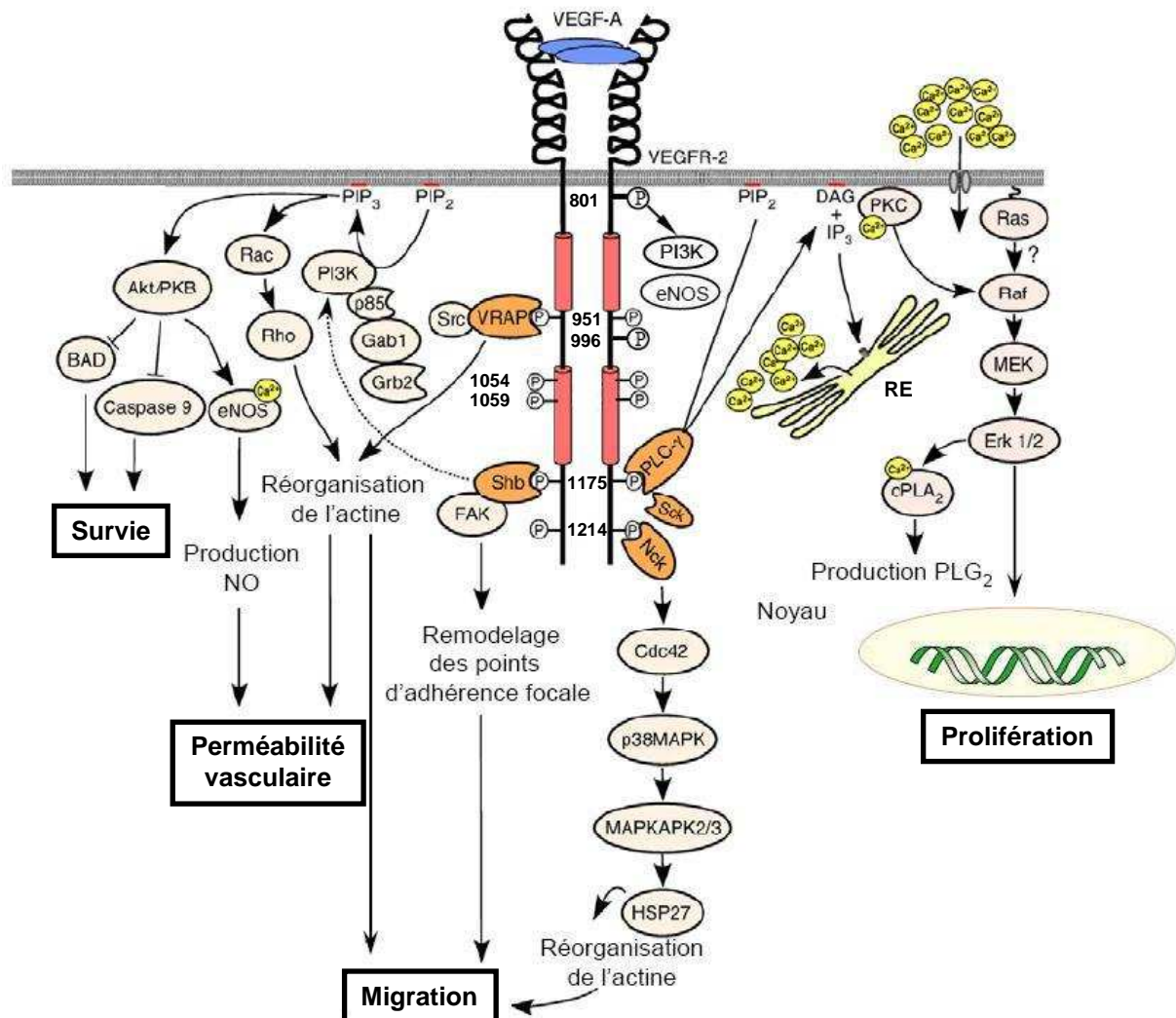


Figure 22 : Signalisation et effets cellulaires induits par le couple VEGFA/VEGFR2

Modifiée d'après Cross MJ *et al.*, Trends Biochem Sci 2003.¹²⁷

• **Signalisation induite par le VEGFR2** : Le VEGFR2 (également appelé KDR ou Flk-1) est un récepteur à activité tyrosine kinase de 200 à 230 kDa, connu pour être le principal récepteur du VEGFA. L'importance du VEGFR2 lors du développement du réseau vasculaire, est illustrée par son effet létal chez l'embryon de souris dont le gène VEGFR2 a été inactivé entre les jours 8.5 et 9.0 consécutif à un défaut de vascularisation.¹²⁸ Le VEGFR2 est fortement exprimé par les progéniteurs des cellules endothéliales au cours de l'embryogenèse précoce, puis son expression diminue à des stades plus tardifs du développement vasculaire. Le VEGFR2 est exprimé à la fois dans les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques ainsi que dans les mégacaryocytes et les cellules souches hématopoïétiques.¹²⁹ Le VEGFR2 est principalement impliqué lors de la croissance, la survie et la migration des cellules endothéliales nécessaires à l'angiogenèse durant l'embryogenèse ainsi que la vie adulte.⁸³ La surexpression du VEGFR2 est observée dans des conditions pathologiques telles que l'angiogenèse tumorale.¹³⁰ L'affinité du VEGFA pour le VEGFR2 est plus faible que son affinité pour le VEGFR1 ($K_d = 75$ à 125 pM pour le VEGFR2 contre 10 pM pour le VEGFR1) mais la signalisation induite par le VEGFR2 est plus intense et plus variée que celle induite par le VEGFR1.¹³¹ Cette fixation du VEGFA sur le VEGFR2 induit sa dimérisation et l'autophosphorylation de 7 résidus tyrosine : Tyr⁸⁰¹ dans la portion juxta-membranaire, Tyr⁹⁵¹ et Tyr⁹⁹⁶ se trouvant dans l'insert tyrosine, Tyr¹⁰⁵⁴ et Tyr¹⁰⁵⁹ se trouvant dans le domaine kinase 2 et Tyr¹¹⁷⁵ et Tyr¹²¹⁴ dans l'extrémité C-terminale (figure 22).¹²⁷ Parmi ces sites d'autophosphorylation, les résidus Tyr¹⁰⁵⁴ et Tyr¹⁰⁵⁹ sont essentiels à l'activité kinase maximale du VEGFR2,¹³² tandis que l'autophosphorylation des autres résidus induit l'activation de voies de signalisation sous-jacentes en recrutant des molécules contenant un domaine SH2.¹³³ L'activation de ces voies de signalisation est à l'origine des événements cellulaires de prolifération, de survie, de migration et de perméabilité vasculaire essentiels au processus angiogénique.

➤ *Prolifération* : Comme la plupart des récepteurs à activité tyrosine kinase, le VEGFR2 induit la prolifération des cellules endothéliales via l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1 et 2 (figure 22). Le mécanisme d'activation de cette voie de signalisation est particulier. En effet, au lieu d'activer directement le complexe Ras, le VEGFR-2 recrute la PLC- γ via son domaine de liaison SH2 sur son site Tyr¹¹⁷⁵. La PLC- γ induit ensuite l'activation de la Protein Kinase C (PKC), phosphorylant elle-même Raf indépendamment de Ras.¹³⁴ Les sites Tyr⁹⁵¹ et Tyr⁹⁹⁶ ont également été démontrés comme responsables de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 grâce au même mécanisme d'activation.¹³⁵

Enfin, l'autophosphorylation du site Tyr¹⁰⁵⁹ est essentielle pour la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA.¹³⁶

➤ *Survie* : Le VEGFR2 active également la PI3K induisant une augmentation de phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (PIP₃) responsable de l'activation de molécules de signalisation dont Akt. La voie de signalisation Akt est connue pour réguler la survie cellulaire en inhibant les protéines de signalisation pro-apoptotiques telles que B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated death promoter (BAD) et Caspase 9 (figure 22).¹³⁷ L'activation de la PI3K par le VEGFR2 se fait grâce au recrutement de la protéine adaptatrice Src homology 2 domain-containing adapter protein B (Shb) nécessaire à l'activation de la PI3K sur le site Tyr¹¹⁷⁵.¹³⁸

➤ *Migration* : L'activation du VEGFR2 par le VEGFA est aussi à l'origine de l'induction de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la migration des cellules endothéliales. Le site Tyr¹¹⁷⁵ est notamment impliqué dans ce phénomène via le mécanisme précédemment cité faisant intervenir la voie de signalisation Shb > PI3K > Akt (figure 22).¹³⁹ Shb est également capable de recruter les protéines Focal-Adhesion Kinases (FAK) et leur substrat paxilline, tous les deux impliqués dans le renouvellement des adhérences focales nécessaire à la migration des cellules endothéliales.^{140,141} Le site d'autophosphorylation Tyr⁹⁵¹ est également impliqué dans la migration des cellules endothéliales. En effet, ce site permet le recrutement de la protéine adaptatrice T-cell-specific adaptator (TSAd) également appelée VEGF receptor-associated protein (VRAP). Plusieurs études ont ainsi démontré que la voie de signalisation Tyr⁹⁵¹-TSAd est impliquée dans la migration des cellules endothéliales induite par le VEGFA.^{136,142} La phosphorylation du site Tyr¹²¹⁴ est impliquée dans le remodelage de l'actine induit par le VEGFA via le recrutement de la protéine adaptatrice Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1 (Nck) puis l'activation séquentielle de la protéine Cell Division Cycle 42 (CDC42) puis de la protéine MAP-Kinase p38.¹⁴³

➤ *Perméabilité vasculaire* : Le site Tyr¹¹⁷⁵ participe également à la perméabilité vasculaire en permettant la production d'oxyde nitrique (NO) grâce à la phosphorylation du résidu sérine 1177 et l'activation directe de l'endothelial NO synthase (eNOS) par Akt (figure 22). Le site Tyr⁸⁰¹ serait lui aussi indispensable à la phosphorylation de la eNOS par Akt.¹⁴⁴ Les protéines constituant les jonctions adhérentes jouent aussi un rôle prépondérant lors de la perméabilité vasculaire. L'activation du VEGFR2 conduit à la phosphorylation des VE-cadhérines induisant un relâchement de ces jonctions.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ Il semble que la protéine kinase Transforming (sarcoma inducing) gene of Rous sarcoma virus (Src) est nécessaire pour

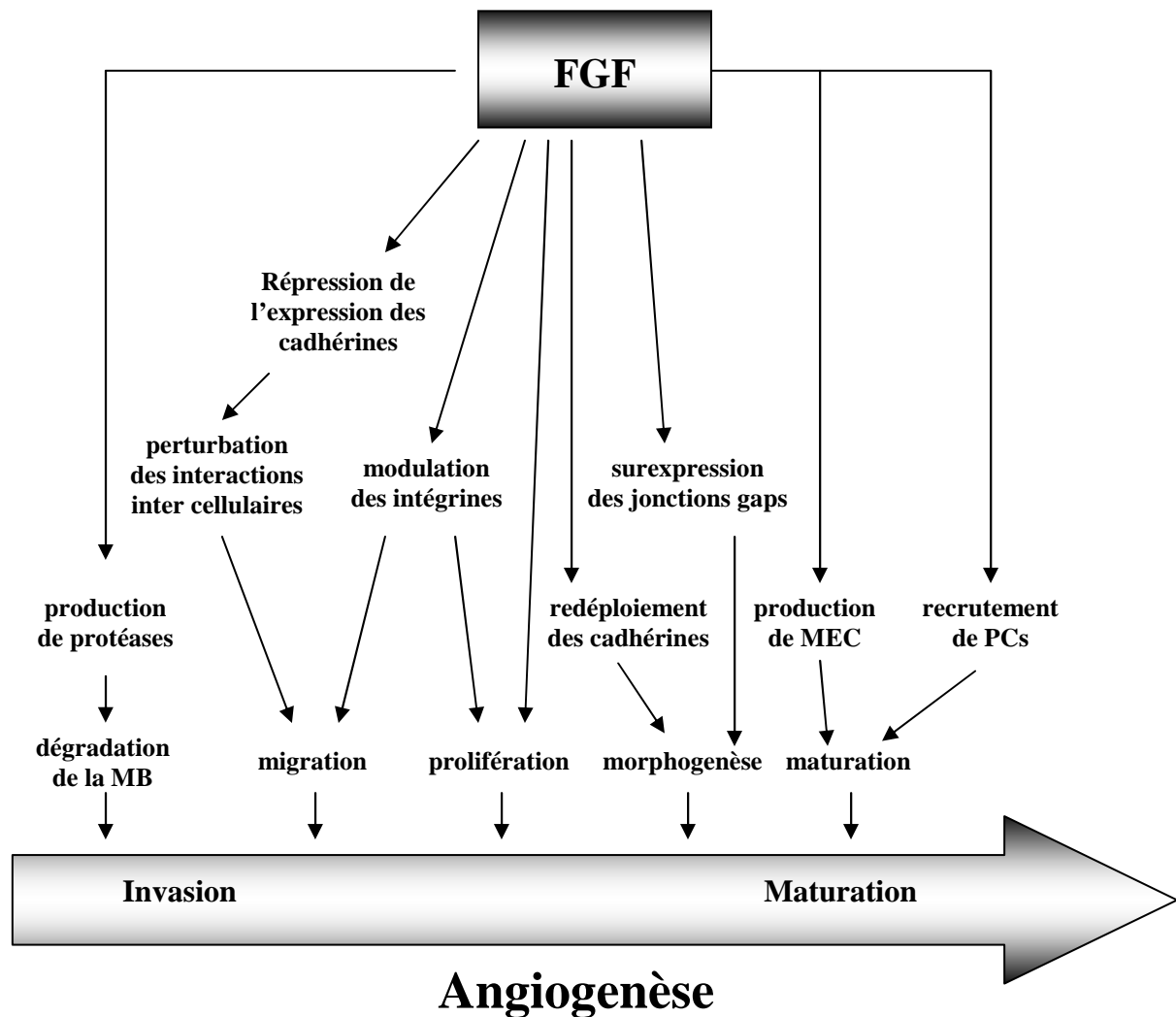


Figure 23 : Implication du FGF au cours des événements cellulaires nécessaires à l'angiogenèse

Modifiée d'après Presta M *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev 2005.¹⁴⁹

permettre la phosphorylation des VE-cadhérines et l'induction de la perméabilité vasculaire consécutive *in vivo*.¹⁵⁰⁻¹⁵² Enfin, le VEGFA peut également induire la formation d'un complexe entre TSAd et Src, suggérant que TSAd pourrait réguler l'activation de Src induite par le VEGFR2 ainsi que la perméabilité vasculaire qui en découle.¹⁴²

1.2 Le FGF2

La famille du facteur de croissance fibroblastique (FGF, Fibroblast Growth Factor) comprend 22 membres chez l'Homme dont la taille varie de 17 à 34 kDa.¹⁵³ La plupart des FGF stimule diverses fonctions cellulaires, dont la migration, la prolifération et la différenciation cellulaires.¹⁵⁴ Ces événements sont essentiels pour une grande variété d'évènements physiologiques et pathologiques tels que l'angiogenèse,¹⁴⁹ la vasculogenèse,¹⁵⁵ la cicatrisation,¹⁵⁶ la croissance tumorale¹⁵⁷ et le développement embryonnaire.¹⁵⁸ Ces effets cellulaires sont consécutifs à leur fixation sur leurs récepteurs à activité tyrosine kinase (FGFR1, FGFR2, FGFR3 et FGFR4.)¹⁵⁹ Parmi les 22 membres de cette famille, peu ont fait l'objet de recherches concernant leur potentiel angiogénique *in vitro* et *in vivo*, les membres les plus étudiés étant le FGF1 et le FGF2. Le FGF2 est un polypeptide de 18 kDa existant sous 5 isoformes issues de l'épissage alternatif de son ARNm. Il est sécrété par les cellules myocardiques, les cellules tumorales, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Il induit les événements cellulaires requis lors du processus angiogénique *in vivo* et *in vitro* sur des cellules endothéliales (figure 23). Ainsi, l'activation du FGFR1 et du FGFR2 par le FGF2 induit la prolifération¹⁶⁰ et la migration des cellules endothéliales,^{161,162} via la voie de signalisation de la PKC comme cela est le cas pour le VEGFA pour la prolifération,¹⁶³ mais aussi pour la migration.¹⁶⁴ De plus, le FGF2 est connu pour réguler l'expression des molécules d'adhérence telles que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ ^{165,166} et les cadhérines^{167,168} mais aussi augmenter la production et la sécrétion des MMPs et de l'uPA par les cellules endothéliales leur permettant de dégrader la matrice extracellulaire.¹⁴⁹ Enfin, le FGF2 augmente la formation d'un réseau capillaire par les cellules endothéliales *in vitro*¹⁶⁹ en présence du VEGFR1¹⁷⁰ soulignant ainsi les interactions entre les voies de signalisation activées par le FGF2 et du VEGFA. Le FGF2 permet la néovascularisation indirectement par activation du système VEGF/VEGFR. En effet, d'une part, les antagonistes du VEGFR2 inhibent l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro* induite à la fois par le VEGFA et par le FGF2,¹⁷¹ d'autre part, le FGF2 endogène et exogène augmente l'expression du VEGFA¹⁷² ainsi que des FGFRs et des VEGFRs¹⁷³ par les cellules endothéliales. Ces interactions avec le VEGFA sont également bien illustrées par l'induction de la différenciation endothéliale et de l'angiogenèse *in vivo*

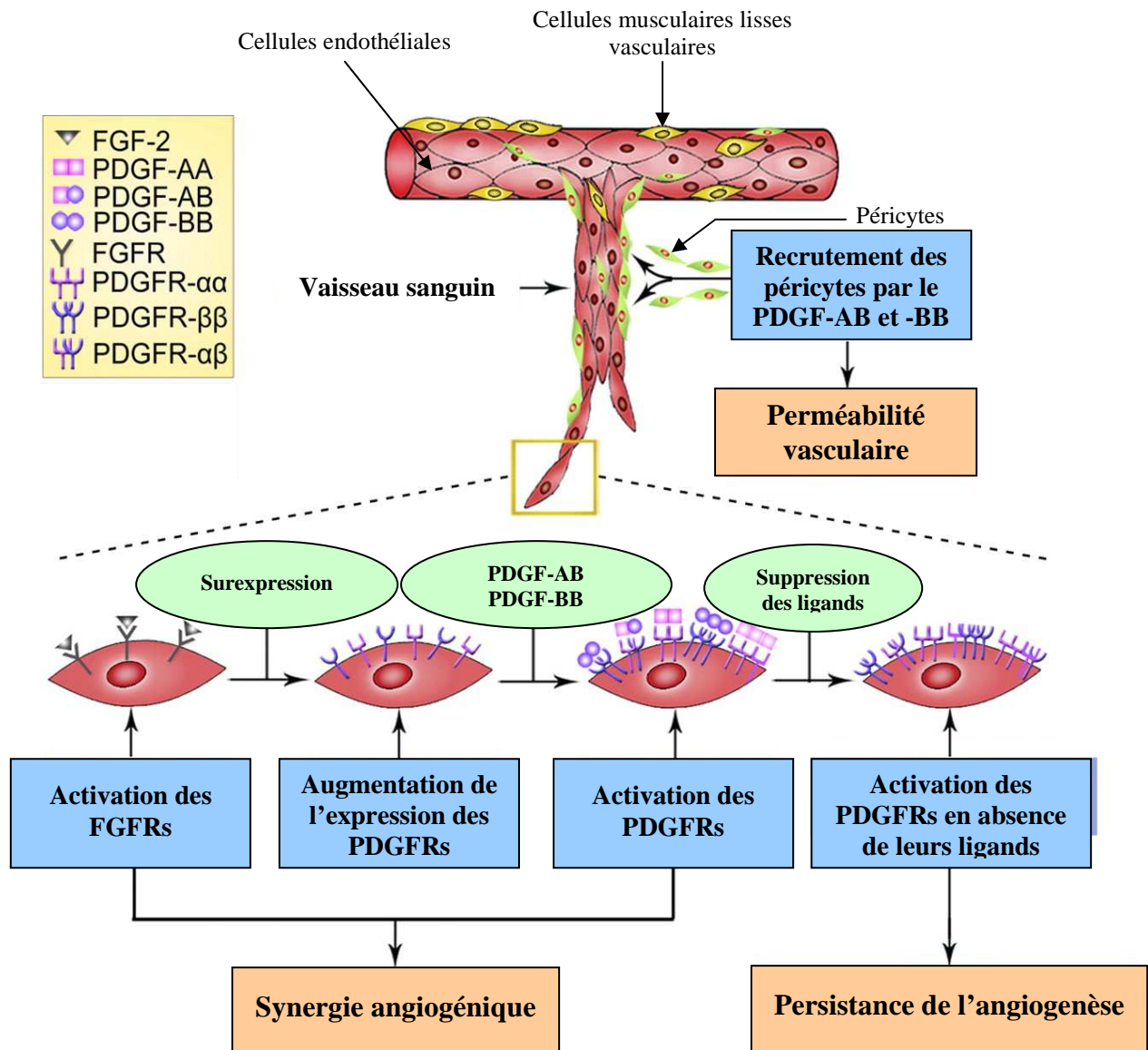


Figure 24 : Implication du PDGF au cours de l'angiogenèse

Zhang J *et al.*, Faseb J 2009.¹⁷⁴

par synergie entre le FGF2 et le VEGFA.¹⁷⁵ Le FGF2 agit sur les cellules endothéliales de manière paracrine suite à sa sécrétion par les cellules tumorales, stromales et/ou leur production à partir de la matrice extracellulaire, mais aussi de manière autocrine suite à sa sécrétion par les cellules endothéliales.¹⁷⁶

1.3 Le PDGF

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF, Platelet-Derived Growth Factor) est une glycoprotéine sécrétée par les plaquettes sous forme d'homo ou d'hétérodimère, composée de deux chaînes A et B générant les 3 isoformes PDGF-AA, PDGF-BB et PDGF-AB. Les membres de cette famille induisent leur signalisation intracellulaire en se fixant sur leurs récepteurs au PDGF, PDGFR- α et PDGFR- β .¹⁷⁷ L'isoforme du PDGF la plus étudiée est le PDGF-BB. Ses cibles principales sont les cellules murales des vaisseaux sanguins telles que les péricytes et les cellules musculaires lisses, qui sont recrutées autour du vaisseau sanguin naissant, favorisant la maturation de ce dernier.¹⁷⁸ Le PDGF-BB stimule l'angiogenèse *in vivo*,^{174,179} le remodelage vasculaire, ainsi que la maturation et la stabilisation des néovaisseaux sanguins grâce au recrutement des péricytes (figure 24).¹⁸⁰ Les souris déficientes pour les gènes du PDGF-BB ou du PDGFR- β meurent *in utero* par altération de la perméabilité vasculaire. Il a été démontré que cette altération de la perméabilité vasculaire est due à un manque de recouvrement des vaisseaux sanguins par les péricytes.¹⁸⁰⁻¹⁸²

1.4 Le système angiopoïétines-récepteur Tie2

Comme nous l'avons précédemment abordé, ce système joue un rôle prépondérant lors de la dilatation et de la perméabilité vasculaire. L'Ang1 et l'Ang2 sont principalement sécrétées par les cellules murales (péricytes et cellules musculaires lisses) et les cellules endothéliales.⁴ Lorsque le vaisseau sanguin est quiescent, l'Ang1 est liée à son récepteur Tie-2 présent à la surface des cellules endothéliales, induisant sa phosphorylation. Cette phosphorylation permet dans un premier temps, le maintien des contacts intercellulaires et des contacts avec la membrane basale, puis dans un deuxième temps le recrutement des péricytes. L'Ang2 est, quant à elle, un antagoniste du récepteur Tie-2 pour lequel elle a la même affinité que l'Ang1. La fixation de l'Ang2 va donc inhiber la phosphorylation de Tie-2, ce qui a pour conséquence de déstabiliser les contacts intercellulaires avec la membrane basale, induisant de ce fait la perméabilité vasculaire (figure 6A). De plus, la déstabilisation de l'endothélium induite par Ang2 le rendrait plus susceptible de répondre aux facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGFA.¹⁸³ En l'absence du VEGFA, Ang2 entraîne la régression des vaisseaux sanguins.⁴

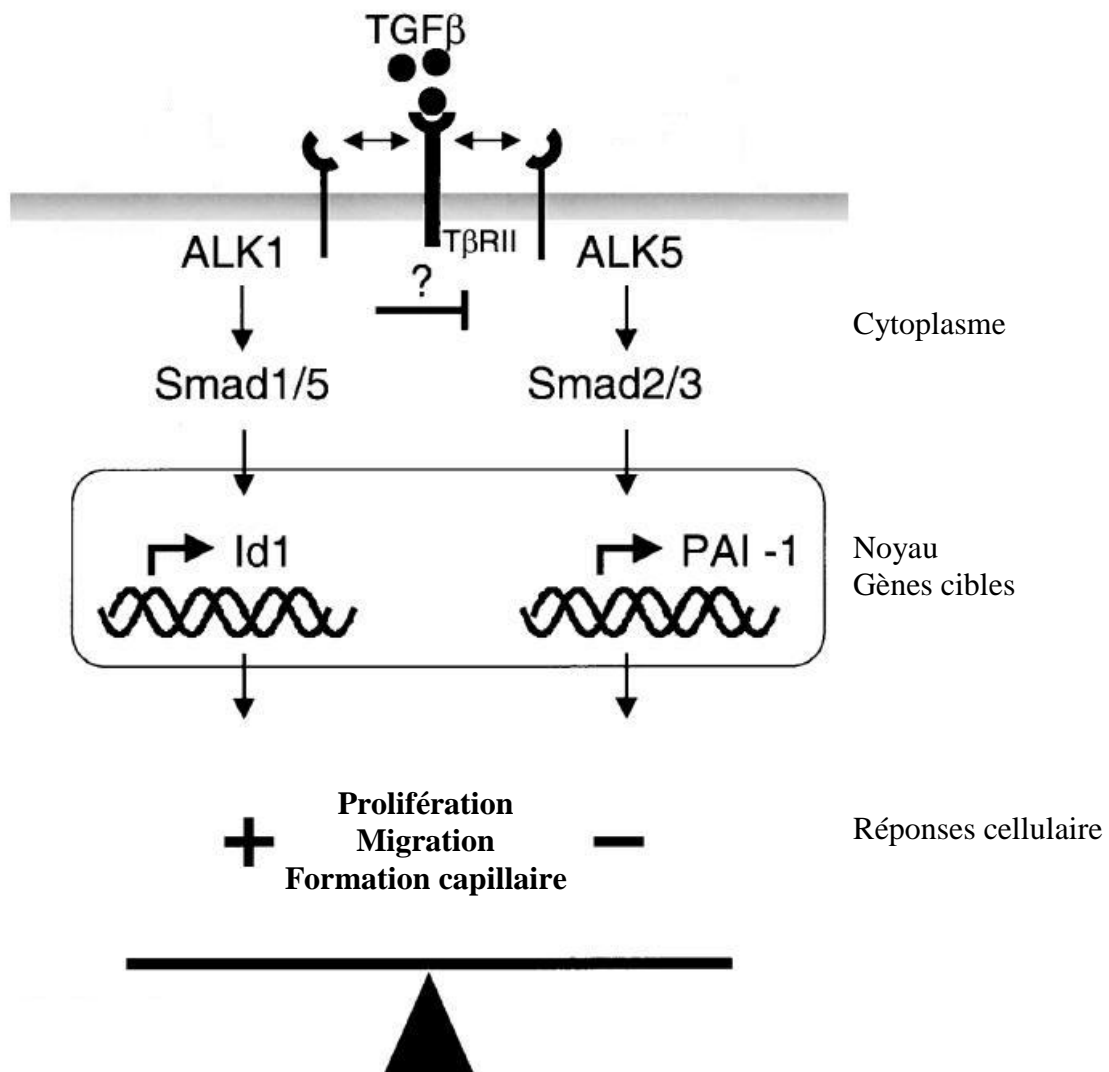


Figure 25 : Implication du TGF- β au cours de l'angiogenèse

Modifiée d'après Goumans MJ *et al.*, Trends Cardiovasc Med 2003.¹⁸⁴

1.5 Les Métalloprotéinases Matricielles

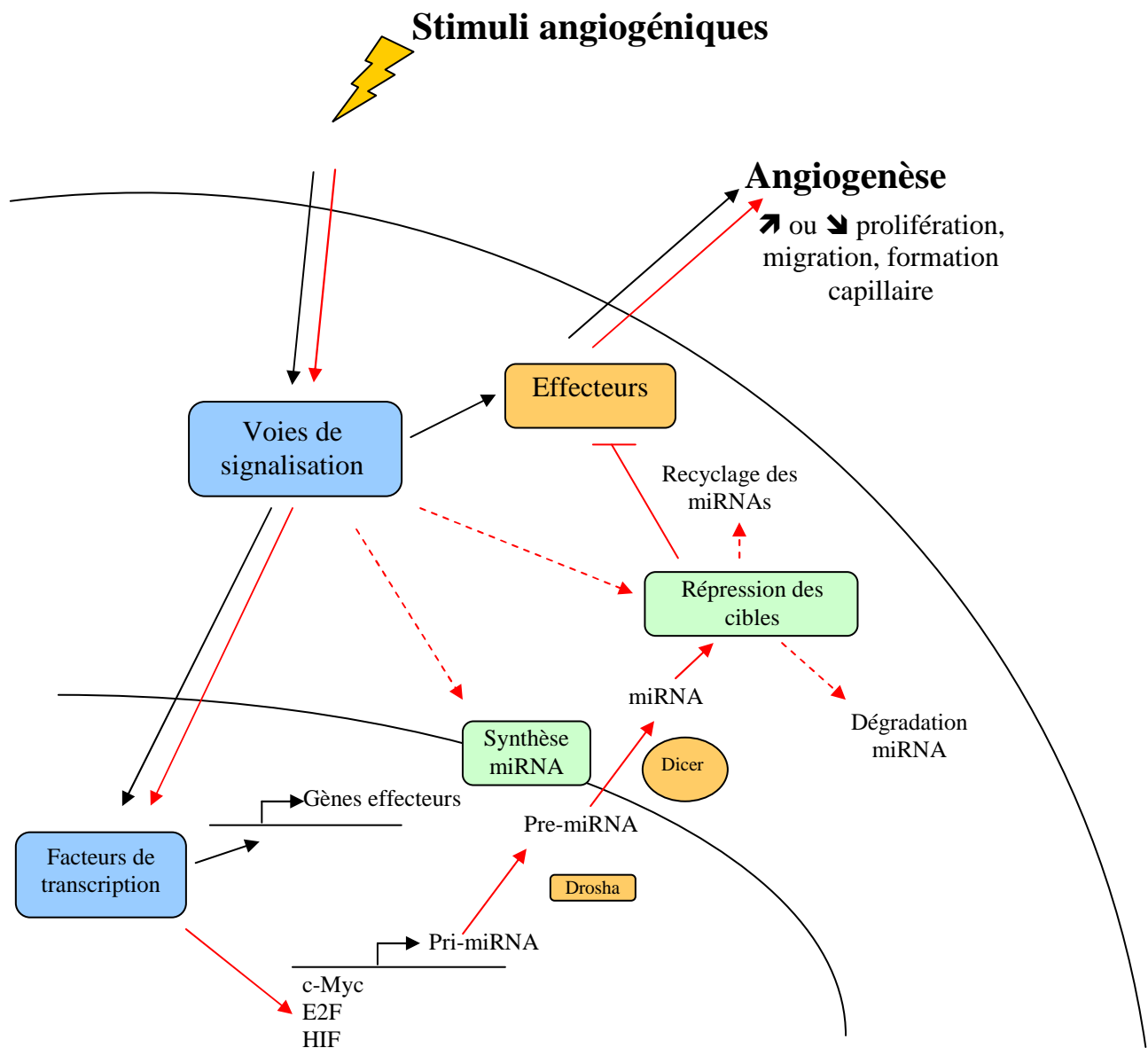
La dégradation de la matrice extracellulaire constitue un évènement clé pour la migration des cellules endothéliales. Les MMPs sont principalement impliquées dans ce phénomène, ainsi que dans le remodelage de la matrice extracellulaire et la libération de facteurs pro- (FGF2, VEGFA, TGF- β , etc...)⁴ ou anti-angiogéniques (TSP-1, endostatine, etc...)^{58,59} à partir de la matrice extracellulaire.⁶⁰

1.6 Les cytokines pro-angiogéniques

Les cytokines sont regroupées dans une superfamille de protéines solubles de 8 à 50 kDa, non spécifiques. Elles sont principalement sécrétées par les cellules du système immunitaire ainsi que par un grand nombre de cellules et/ou tissus. Cette sécrétion par les tissus leur permet de réguler leur fonction ou de recruter les cellules du système immunitaire. Leur action autocrine (sur les lymphocytes T) ou paracrine est essentielle au cours du développement embryonnaire, de l'hématopoïèse, du remodelage tissulaire, de la réponse inflammatoire et immunitaire.¹⁸⁵ Elles sont regroupées en différentes familles : les interférons, les interleukines, les chémokines, les Colony Stimulating Factors, la famille du Tumor Necrosis Factor (TNF) et la famille du Transforming Growth Factor (TGF).

1.6.1 TGF- β

Le TGF- β est un polypeptide multifonctionnel généré sous forme de précurseur dimérique clivé par des protéases et sécrété.¹⁸⁶ Le TGF- β se lie à deux principales classes de récepteurs à activité sérine/thréonine kinase : les récepteurs de type II tels que le TGF- β type II receptor (T β RII) et les récepteurs de type I également appelés activin receptor-like kinase (ALKs) tels que ALK5.^{187,188} Le TGF- β induit sa signalisation dans les cellules endothéliales en activant les récepteurs ALK5 et ALK1,^{189,190} l'expression de ce dernier est restreinte à l'endothélium vasculaire.¹⁹¹ Il est impliqué dans le développement du système vasculaire, affecte le fonctionnement des cellules endothéliales et murales. Cependant ces réponses au TGF- β sont complexes et relèvent aussi bien d'une stimulation que d'une inhibition de l'angiogenèse.¹⁹² En effet, les études menées chez les souris déficientes pour le gène du TGF- β montrent que les embryons de ces souris meurent *in utero* à cause d'une déficience de vasculogenèse.^{189,193,194} De plus, le rôle pro-angiogénique du TGF- β au cours de l'angiogenèse *in vivo* est bien documenté.¹⁹⁵ *In vitro* la situation semble plus complexe, car si le couple TGF- β /ALK1 stimule la prolifération, la migration et la formation du réseau capillaire via le recrutement de Smad1/5,^{192,196,197} le couple TGF- β /ALK5 inhibe la

**Figure 26 : Régulation de l'angiogenèse par les miRNAs**Modifiée d'après Suarez Y et Sessa WC, Circ Res 2009.¹⁹⁸

- Voies angiogéniques induites classiquement
- Participation des miRNA lors de l'angiogenèse

L'activation des voies de signalisation par les facteurs environnementaux, peut modifier l'activité en affectant leur expression, leur production, et leur dégradation (lignes **rouges**). La régulation des effecteurs angiogéniques induite par les miRNA permet une régulation fine des processus angiogéniques par rétrocontrôle.

prolifération,¹⁹⁹ la migration et la formation du réseau capillaire via le recrutement de Smad2/3 (figure 25)^{190,196}. Enfin, si le TGF- β est capable d'augmenter l'expression et l'activité d'autres facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGFA^{200,201} et le PDGF,²⁰² il est aussi capable d'inhiber l'angiogenèse induite par le FGF2 *in vitro*.²⁰³

1.6.2 TNF- α

La famille des TNF est constituée par deux isoformes : le TNF- α et le TNF- β partageant plus de 32% d'homologie de séquence en acides aminés. Le TNF- α est un polypeptide homodimérique de 17 kDa transmembranaire pouvant agir de manière juxtacrine ou paracrine après clivage. La forme soluble du TNF- α ainsi générée est capable d'induire une signalisation intracellulaire en se fixant sur deux récepteurs : le p55 TNF Receptor (CD120a) et le p75 TNF Receptor (CD120b).²⁰⁴ Le TNF- α est capable d'induire l'angiogenèse *in vivo*^{205,206} et stimule la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales²⁰⁷ et leur migration²⁰⁶ *in vitro*. Cependant, il inhibe également la prolifération des cellules endothéliales induite par le FGF2 et le VEGFA *in vitro*.^{205,208,209} L'ensemble de ces controverses concernant le rôle des cytokines au cours de l'angiogenèse a amené le concept de dépendance à l'environnement. Le rôle des cytokines pourrait ainsi être dépendant de la concentration de celles-ci^{184,210} et/ou pourrait également être médié par différents facteurs angiogéniques tels que le PDGF,²¹¹ le FGF2²¹² ou le VEGFA.^{212,213}

1.7 Les micro-ARN (miRNA)

Les micro-ARN sont de petits ARN non codant de 20 à 25 nucléotides régulant négativement l'expression de gènes cibles au niveau post-transcriptionnel.^{214,215}

Le rôle joué par les miRNAs au cours de l'angiogenèse a été déterminé par mutation de la ribonucléase III appelée Dicer, enzyme limitante impliquée lors de la maturation des miRNAs (figure 26).¹⁹⁸ La régulation post-transcriptionnelle par les miRNAs joue un rôle prépondérant au cours du développement, de la différenciation, du métabolisme, de la croissance, de la prolifération et de l'apoptose.²¹⁴⁻²¹⁷ Plus de 700 miRNAs ont été clonés à l'heure actuelle et les prédictions bio-informatiques indiquent qu'ils réguleraient 30% de l'ensemble des protéines.^{218,219} La génération de souris homozygotes *Dicer*^{ex1/2} pour lesquelles les séquences d'acides aminés des deux premiers exons du gène codant pour le Dicer ont été supprimées, a permis de mettre en évidence le rôle joué par ce dernier au cours de l'angiogenèse embryonnaire.²²⁰ La létalité de cette modification génique est attribuée à un défaut de vascularisation du sac embryonnaire associé à l'altération de l'expression du

| miRNA | Cibles (directes ou indirectes) | Effet | Implication angiogénique |
|--------------------|--------------------------------------|--|----------------------------------|
| Cluster miRs-17-92 | Tsp-1, E2F1, CTGF, PTEN Bim | ↗ angiogenèse tumorale et induite par les cellules endothéliales | pro-angiogéniques |
| Let-7f et miR-27b | Non déterminé | ↗ angiogenèse induite par les cellules endothéliales | |
| miR-126 | Spred-1, PI3KR2/p85-β, VCAM-1 | ↗ angiogenèse tumorale et induite par les cellules endothéliales | |
| miR-130a | GAX, HOXA5 | ↗ angiogenèse induite par les cellules endothéliales | |
| miR-210 | EphrineA3 | ↗ angiogenèse induite par les cellules endothéliales | |
| miR-296 | HGS | ↗ angiogenèse tumorale et induite par les cellules endothéliales | |
| miR-378 | Sufu, Fus-1 | ↗ angiogenèse tumorale | |
| miRs-221 et 222 | c-kit, eNOS, p27/Kip1 | ↗ angiogenèse tumorale ↘ angiogenèse induite par les cellules endothéliales | Dépendant du micro-environnement |
| miRs-15 et 16 | VEGF, Bcl2 | ↘ angiogenèse tumorale | anti-angiogéniques |
| miRs-155 | ATIR | ↘ angiogenèse induite par les cellules endothéliales | |
| miRs-214 | hepatoma-derived growth factor (HDF) | ↘ angiogenèse tumorale | |

Tableau 1 : Rôle de certains miRNA au cours de l'angiogenèse

Modifié d'après Suarez Y et Sessa WC, Circ Res 2009.¹⁹⁸

VEGFA et de ses récepteurs. Le Dicer joue donc un rôle prépondérant au cours de l'angiogenèse embryonnaire, probablement via la régulation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques clés par les miRNAs.²²⁰ L'implication des miRNAs dépendants de la maturation par le Dicer lors de la signalisation vasculaire et des événements cellulaires liés à l'angiogenèse a été confirmée par la suite *in vitro* et *in vivo*.²²¹⁻²²⁴ De plus, la nécessité de miRNAs endothéliaux lors de l'angiogenèse post-natale a été testée grâce à la génération de lignées de souris pour lesquelles le gène codant pour le Dicer est réprimé de manière conditionnelle dans les cellules endothéliales.²²³ Cette étude a montré une diminution de l'angiogenèse induite par le VEGF chez ces souris. Enfin, l'environnement et notamment les facteurs pro-angiogéniques peuvent modifier le taux d'expression des miRNAs (figure 26).¹⁹⁸

La première analyse à grande échelle de l'expression de miRNAs dans les cellules endothéliales réalisée sur les HUVECs, a permis d'identifier 15 miRNAs fortement exprimés comme cibles potentielles suite à l'activation de récepteurs par leur ligand pro-angiogénique.²²⁵ Par la suite, d'autres études ont complété cette première observation afin d'établir la liste suivante : miR-15b, -16, -20, -21, -23a et b, -24, -29a et b, -31, -100, 106, -125a et b, -126, -130a, -181a, -191, -221, -222, -320, -let7, -let7-b à d.^{221,222,225} Cependant les cibles et les fonctions (pro- ou anti- angiogéniques) de ces miRNAs au cours de l'angiogenèse n'ont été caractérisées que pour certains d'entre eux (tableau 1).¹⁹⁸

2 Les facteurs anti-angiogéniques

2.1 Les facteurs anti-angiogéniques endogènes

Les inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse incluent une large variété de peptides, métabolites d'hormones, et de modulateurs de l'apoptose.^{21,51,226,227}

2.2 Les facteurs anti-angiogéniques dérivés de la matrice extracellulaire

Il est désormais bien connu que les composants de la membrane basale sont capables de réguler les fonctions des cellules endothéliales en plus de leur fournir un support structural et fonctionnel.²²⁸ Un ensemble d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse a été décrit dans lequel se trouve un grand nombre de fragments naturels des protéines de la matrice extracellulaire.²²⁹

2.2.1 L'endostatine

L'endostatine est un fragment de 20 kDa dérivé du domaine NC1 de la partie C-terminale du collagène de type XVIII.²³⁰ Des études ont démontré que l'endostatine interfère avec les voies de signalisation induites par le TNF- α ²³¹ et le FGF2 dans les cellules endothéliales, bloquant la migration²³² et la prolifération²³³ et favorisant l'apoptose.²³⁴ L'endostatine régule également l'ensemble de la signalisation induite par le VEGFA en interagissant directement avec le VEGFR2.²³⁵ De plus, elle inhibe rapidement les voies de signalisation angiogéniques ainsi que l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la croissance cellulaire et la résistance à l'apoptose des cellules endothéliales.²³⁶ Les effets anti-angiogéniques de l'endostatine sont accentués suite à sa fixation sur les molécules d'adhérence telle que l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. En se fixant sur cette intégrine, l'endostatine induit le blocage de la voie de signalisation des MAP-Kinases, aboutissant à l'inhibition de la prolifération médiée par Erk 1/2 et de la migration médiée par p38.²³⁷ Elle peut également se fixer sur les héparanes sulfates protéoglycanes de surface impliqués lors de la signalisation par les facteurs de croissance.²³⁸⁻²⁴⁰ L'endostatine réduit la capacité invasive des cellules endothéliales en inhibant l'activation et l'activité de certaines MMPs telles que les MMP-2 et -9,²⁴¹⁻²⁴³ ainsi que l'activateur du plasminogène.²⁴⁴ Il a été démontré que certaines MMPs sont capables de produire des peptides contenant de l'endostatine de différentes tailles (20 à 30 kDa) à partir du collagène de type XVIII, suggérant un rétrocontrôle négatif de l'endostatine sur sa propre production.²⁴⁵

L'endostatine existe sous forme de monomères dont les propriétés ont été préalablement décrites mais aussi sous forme de trimères dont la fonction serait d'induire la migration cellulaire.^{246,247} L'existence du rétrocontrôle négatif de l'endostatine sur sa production pourrait permettre la prévention de ces trimères. Enfin, il existe un décalage important entre la concentration circulante (40 à 100 ng/ml) et la concentration pour laquelle l'endostatine inhibe la croissance tumorale (5 à 10 µg/ml *in vitro* et 0,2 à 20 mg/ml *in vivo*). Ceci suggère que l'effet de l'endostatine serait plus consécutif à de fortes concentrations locales qu'à sa véritable fonction physiologique.

2.2.2 Les thrombospondines (TSPs)

Les TSPs font partie d'une large famille de glycoprotéines matricielles connues pour réguler un panel important de fonctions biologiques telles que l'adhérence, la prolifération, la survie, l'invasion (en inhibant l'activation de protéases), l'activation du TGF-β et l'angiogenèse.^{248,249} Parmi ces protéines, la TSP1 fut la première protéine reconnue comme facteur anti-angiogénique naturel.²⁵⁰ Le rôle anti-angiogénique et anti-tumoral de la TSP1 est bien documenté dans la littérature.²⁵¹⁻²⁵⁷ La TSP1 est notamment capable de bloquer la signalisation induite par le FGF2 ainsi que par le VEGF grâce à l'existence de deux sous-domaines distincts et spécifiques à chacun de ces facteurs.²⁵¹ De plus, elle serait capable de discriminer lors de son action inhibitrice la néovascularisation pathologique de la vascularisation physiologique. En effet, le récepteur du ligand FasL (Fas Ligand) est faiblement exprimé dans les cellules endothéliales quiescentes mais est surexprimé suite à la stimulation par les facteurs pro-angiogéniques. Ainsi, les inhibiteurs augmentant l'expression de FasL tels que la TSP1 sensibiliseraient spécifiquement les cellules endothéliales à l'apoptose. En effet, les cellules endothéliales surexpriment le récepteur de FasL suite à leur stimulation par les facteurs pro-angiogéniques.²⁵⁸ Cependant certaines études suggèrent une double activité de la TSP1 (pro-angiogénique et anti-angiogénique) dépendant du type de protéase impliqué dans sa propre production via la matrice extracellulaire.^{249,259} La TSP2 présente également une activité anti-angiogénique *in vitro* et *in vivo*, dont le mécanisme sous-jacent serait une inhibition de la migration et de la formation du réseau capillaire des cellules endothéliales induites par le VEGFA, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose.²⁶⁰

2.3 Les facteurs de croissance et les cytokines

2.3.1 Le Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF)

Depuis 1999, le PEDF est considéré comme le principal inhibiteur de l'angiogenèse oculaire chez les mammifères et est impliqué dans les pathologies oculaires, telle que la rétinopathie diabétique.²⁶¹⁻²⁶⁴ Dans les modèles animaux de pathologies hypoxiques oculaires, l'expression du PEDF est supprimée par l'hypoxie induisant alors la néovascularisation de la rétine.^{261,265} Dans des modèles de cancers, la surexpression du PEDF inhibe la progression et l'invasion des gliomes,²⁶⁶ réduit la croissance tumorale et la vascularisation des mélanomes.²⁶⁷ L'activité anti-angiogénique du PEDF est réversible et spécifique aux nouveaux vaisseaux sanguins en prolifération. Cette activité, tout comme pour la TSP-1, serait dépendante de la surexpression de Fas-L induite par le PEDF dans les cellules endothéliales aboutissant à leur apoptose.²⁵⁸ En condition physiologique, il existerait un équilibre entre le PEDF et le VEGFA au cours duquel le PEDF contrecarrerait les effets cellulaires du VEGFA. Lors d'un stress hypoxique, l'expression du PEDF diminuerait, faisant pencher la balance en faveur du VEGFA.²⁶⁸ Cet équilibre serait primordial pour prévenir le développement de la néovascularisation oculaire.^{262,269}

2.3.2 Les Interleukines

Les interleukines font partie de la grande famille des cytokines sécrétées par les leucocytes afin d'activer les lymphocytes. Certaines d'entre elles sont également capables d'influencer l'angiogenèse. Ainsi l'IL-1 β , l'IL-4, et l'IL-18 sont connues pour inhiber l'angiogenèse induite par le FGF2.²⁷⁰⁻²⁷²

2.4 Autres facteurs anti-angiogéniques

2.4.1 L'angiostatine

La famille des angiostatines regroupe de petits peptides de 28 à 45 kDa issus du clivage du plasminogène par des protéases.²⁷³⁻²⁷⁵ Parmi les protéases capables de générer l'angiostatine, les membres de la famille des MMPs tels que les MMP-2, -3, -7, -9 et -12 sont les plus connus.^{274,276-278} L'angiostatine est connue pour inhiber la prolifération et la migration des cellules endothéliales,²⁷⁹ mais n'a pas d'effet sur la signalisation induite par les facteurs de croissance.²⁸⁰ Plusieurs hypothèses ont été proposées comme mécanisme d'action de l'angiostatine : soit l'angiostatine se lie directement à l'Adénosine triphosphate (ATP) synthase à la surface des cellules endothéliales modifiant ainsi le pH intracellulaire conduisant

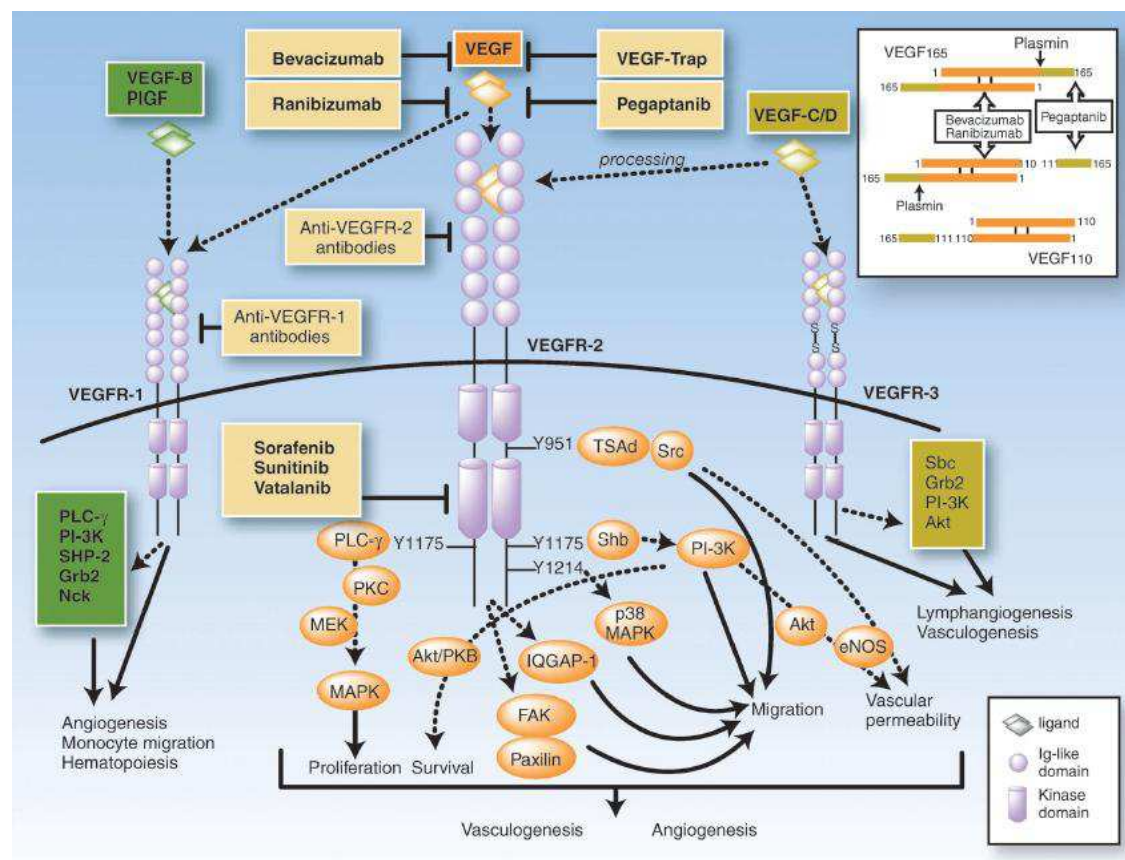


Figure 27 : Exemple de ciblage de la signalisation du VEGFR2

Kowanetz M et Ferrara N, Clin Cancer Res 2006.²⁸¹

| Substance | Cibles | Indication | ↗ survie sans progression (mois) | ↗ survie générale (mois) |
|----------------------------|--|---|----------------------------------|--------------------------|
| Bevacizumab | VEGFA | Cancer colorectal métastatique | 1,4 à 4,4 | 1,4 à 4,7 |
| | | Cancer pulmonaire non à petites cellules métastatique | 0,4 à 1,7 | 2 |
| | | Cancer mammaire métastatique | 0,8 à 5,9 | Non renseigné |
| | | Carcinome rénal | 3,3 à 4,8 | Non renseigné |
| Sorafenib (BAY 43-9006) | VEGFR2, -3 PDGFR, RET c-kit, Raf | Carcinome rénal | 2,7 | Non renseigné |
| Sunitinib (SU11248) | VEGFR1, -2 PDGFR, FLT3 c-kit, | Carcinome rénal | 6 | Non renseigné |

Tableau 2 : Anticorps ciblant la signalisation du VEGF et traitement de cancers

Modifié d'après Carmeliet P, Nature 2011.²³

à l'apoptose des cellules endothéliales,²⁸² soit elle se lie à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ inhibant ainsi la migration des cellules endothéliales induite par la plasmine.²⁸³

2.4.2 Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)

Le rôle principal des TIMPs est d'inhiber l'activité des MMPs responsables du remodelage de la matrice extracellulaire. Cependant, les TIMPs jouent également un rôle important lors de l'apoptose, de la prolifération et de la différenciation cellulaires.^{284,285} Ainsi, le TIMP2 inhibe la prolifération *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo* induite par les facteurs pro-angiogéniques, grâce à sa fixation sur l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ présente à la surface des cellules endothéliales, indépendamment de sa fonction inhibitrice des MMPs.²⁸⁶ La fixation de TIMP2 sur l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ permet le recrutement et l'activation de la protéine phosphatase Src-homology-2-domain containing protein tyrosine phosphatase 1 (SHP1)²⁸⁷ responsable de la déphosphorylation des récepteurs VEGFR2²⁸⁸ et FGFR1.²⁸⁹

2.5 Les inhibiteurs du VEGF et de sa signalisation

Certains inhibiteurs, qu'ils soient endogènes ou synthétiques, ciblent plus particulièrement la signalisation intracellulaire induite suite à l'activation du VEGFR2 par le VEGFA. En effet, ces voies de signalisation étant critiques lors de l'induction de l'angiogenèse, elles constituent une cible de choix afin de rendre quiescente une angiogenèse devenue exacerbée et pathologique.

2.5.1 Les anticorps ciblant le VEGF et sa signalisation

En 1971, Judah Folkman est le premier à émettre l'hypothèse d'asphyxier les tumeurs grâce à des traitements anti-angiogéniques.⁵¹ Trois décennies plus tard, en février 2004, le bevacizumab (Avastin®), un anticorps humanisé monoclonal dirigé contre le VEGFA (figure 27), devient le premier inhibiteur de l'angiogenèse approuvé aux Etats-Unis par la Food and Drug Administration (FDA).²⁹⁰ Des études précédentes ont permis de mettre en évidence un meilleur taux de survie chez les patients souffrant d'un cancer colorectal métastatique,²⁹¹ ou d'un cancer du poumon non à petites cellules métastatique,²⁹² ou d'un cancer mammaire métastatique, ou d'un cancer rénal métastatique,²⁹³ lorsque ceux-ci étaient traités avec le bevacizumab combiné à un agent chimiothérapeutique classique (tableau 2). La combinaison du traitement anti-angiogénique associé au traitement chimiothérapeutique repose sur l'hypothèse de normalisation de la vascularisation tumorale précédemment abordée. Le bevacizumab a également prouvé son efficacité dans le traitement de pathologies de néovascularisation oculaires telle que la DMLA,^{294,295} l'œdème maculaire causant l'occlusion

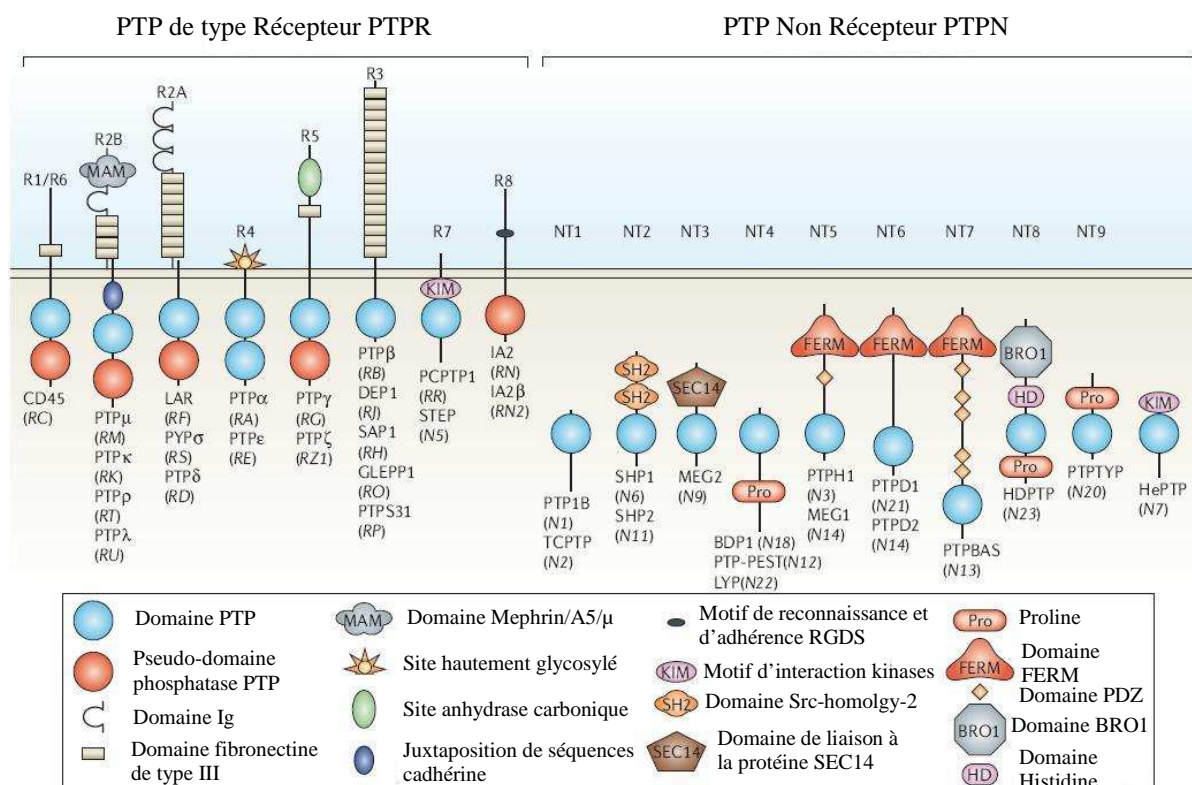


Figure 28 : Structure de la famille des PTP « classiques »

Modifiée d'après Tonks, Nat Rev Mol Cell Biol 2006.²⁹⁶

de la veine centrale de la rétine²⁹⁷ et la rétinopathie diabétique.²⁹⁸ Depuis, plusieurs autres agents bloquants le VEGFA et sa signalisation sont aujourd'hui utilisés cliniquement pour traiter certaines formes de cancer et de pathologies oculaires.^{299,300} Ainsi, le Sunitinib (Sutent[®]) et le Sorfenib (Nexavar[®]), dont les principales cibles sont le VEGFR2, ont été approuvées par la FDA respectivement pour le traitement des tumeurs gastro-intestinales résistantes au Gleevec,³⁰¹ des carcinomes hépatocellulaires³⁰² et conjointement pour le traitement du carcinome rénal avancé (figure 27 et tableau 2).^{303,304} De son côté, le Pegaptanib (Macugen[®]), un aptamer capable de se lier au VEGFA₁₆₅, mais pas au VEGFA₁₂₁ ou aux fragments protéolytiques du VEGFA, a été approuvé en 2004 par la FDA pour le traitement de tous les sous-types angiogéniques de DMLA (figure 27).²⁹⁹ Cependant les bénéfices de survie grâce à ces traitements sont faibles (tableau 2) et les effets secondaires sont multiples, tels que : hypertension, accidents cardiovasculaires, saignements, perforations, l'hypothyroïdisme, protéinuries et œdèmes.^{305,306} De nouvelles études prennent désormais pour cible d'autres facteurs pro-angiogéniques tels que le PlGF.³⁰⁷

2.5.2 Les protéines phosphatases SHP1 et SHP2

2.5.2.1 La famille des protéines phosphatases intracellulaires (PTPs)

L'activation du VEGFR2 étant un évènement prépondérant lors de la réponse angiogénique, son activité se doit d'être finement régulée physiologiquement afin d'éviter l'apparition d'une néovascularisation pathologique. Depuis leur découverte, les protéines phosphatases (PTPs) ont démontré qu'elles régulaient l'activité et la durée de réponse d'un grand nombre de récepteurs à activités tyrosine kinase, dont le VEGFR2.²⁹⁶ Cette famille de protéines qui comporte 107 membres chez l'Homme, se caractérise par une activité enzymatique de déphosphorylation et peut se diviser en deux catégories : les PTPs dites « classiques », dont la fonction est de déphosphoryler uniquement les résidus tyrosines et les PTPs à double spécificité, capables de déphosphoryler à la fois les résidus tyrosine et les résidus sérine/thréonine.³⁰⁸ Le domaine catalytique des PTPs (Domaine PTP en bleu figure 28) est constitué par une séquence de 280 acides aminés, dans laquelle une courte séquence appelée motif de signature, fonctionne comme une boucle de liaison au phosphate au sein du site actif.³⁰⁹ Le résidu cystéine (Cys) du site catalytique des PTPs est essentiel à leur activité, comme en témoigne la diminution d'activité catalytique observée lors d'une expérience de mutagenèse dirigée.³¹⁰ Cette cystéine agit comme un nucléophile lors de la réaction de catalyse, transformant l'atome de phosphate cible en intermédiaire thiophosphate. Un autre résidu important pour la réaction de phosphorylation est l'acide aspartique (Asp) situé dans la

boucle de liaison au phosphate. En agissant comme un acide lors de la réaction de catalyse, il permet au substrat de libérer le groupement phosphate, se détachant ainsi de la PTP.

A ce jour, seules les PTP « classiques » ont démontré une activité régulatrice de l'activation du VEGFR2. Cette sous-famille de PTP comprend 37 membres chez l'Homme³¹¹ et se subdivise elle-même en deux nouvelles catégories : les PTP de type récepteurs transmembranaires (PTP receptor-like : PTPR) et les PTP non récepteurs cytoplasmiques (PTP Non-Transmembrane : PTPN) (figure 28).²⁹⁶ Les PTPR ont la capacité de réguler la signalisation intracellulaire par déphosphorylation des tyrosines cibles suite à la fixation de leur ligand. Leur implication est principalement connue lors de la régulation des molécules d'adhérence cellulaire.²⁹⁶ Les PTPN sont quant à elles caractérisées par la présence de séquences qui flanquent leur domaine catalytique. Ces séquences contrôlent leur activité directement en interagissant avec un site actif modulant leur activité, comme cela est le cas pour la protéine phosphatase Src-homology-2-domain containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2), ou indirectement en contrôlant la spécificité de leur substrat.³¹² Au sein de cette sous-famille de PTP « classiques », 6 sont connues pour leur implication lors de la régulation de l'angiogenèse dépendante du VEGFA : T-Cell protein tyrosine phosphatase (TC-PTP),³¹³ Vascular endothelial protein tyrosine phosphatase (VE-PTP),³¹⁴⁻³¹⁶ PTP1B,³¹⁷ Density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1),¹³⁵ SHP1 également appelée tyrosine-protéine phosphatase non-receptor type 6 (PTPN6),^{287,318,319} et SHP2 également appelée tyrosine-protéine phosphatase non-receptor type 11 (PTPN11).³²⁰⁻³²²

Par la suite, les phosphatases Src homology-2 (SH2) domain-containing phosphatases : SHP1 et SHP2 seront particulièrement décrites.

2.5.2.2 Les protéines SHPs

Les protéines SH2 domain-containing phosphatases (SHP) constituent une petite sous-famille de PTPNs hautement conservées comprenant deux membres chez les Vertébrés : les protéines phosphatases SHP1 et SHP2.³²³

• **Structure et activation :** La majorité des études concernant les SHPs a été focalisée sur la fonction de SHP2. Néanmoins, les similarités de structure du domaine PTP de SHP1 et de SHP2,^{324,325} leurs propriétés enzymologiques comparables et la forte conservation des résidus impliqués dans leur inhibition basale au cours de l'évolution, suggèrent que leurs mécanismes de régulation sont analogues.^{323,326,327}

Les SHPs sont composées de deux domaines SH2 de 100 acides aminés situés à l'extrémité N-terminale de la protéine appelés N-SH2 et C-SH2, ainsi que de deux sites de

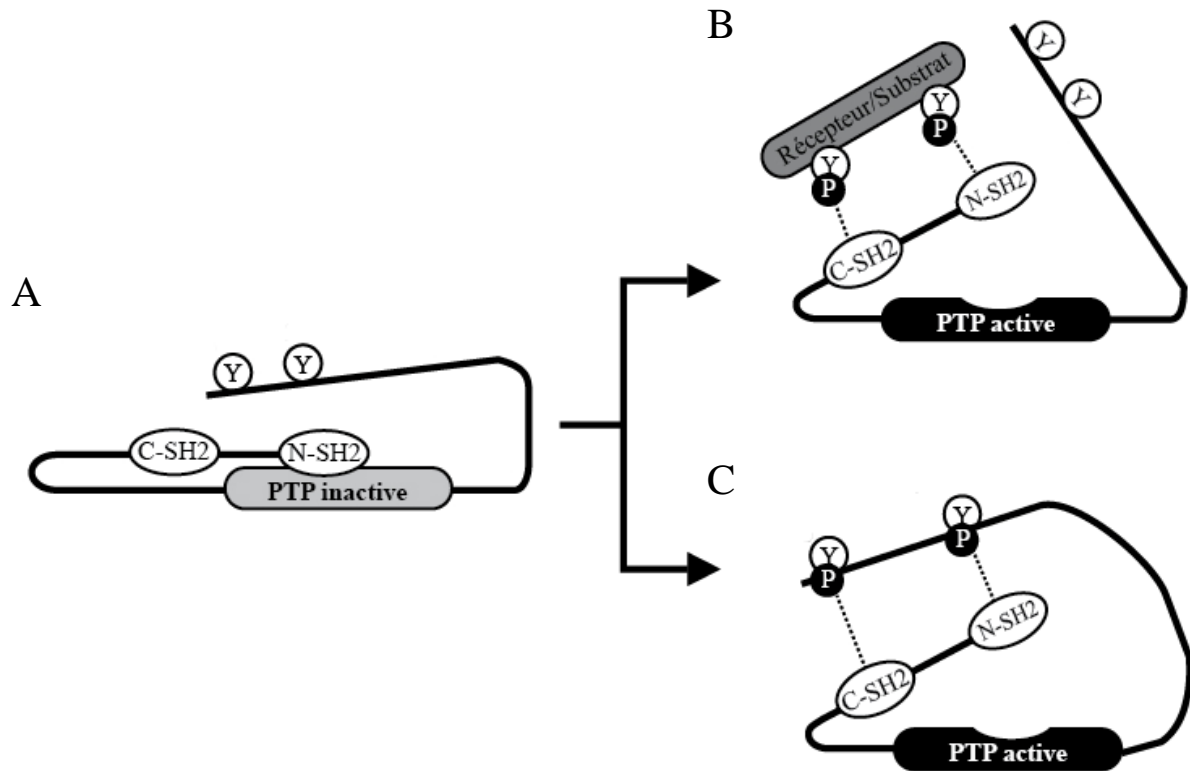


Figure 29 : Structure et activation des protéines SHPs

Modifiée d'après Mannell H et Krotz F, Mini Rev Med Chem 2012.³²⁸

- (A) Protéine phosphatase inactive.
- (B) Activation des protéines phosphatases par fixation d'un ligand.
- (C) Activation des protéines phosphatases par phosphorylation.

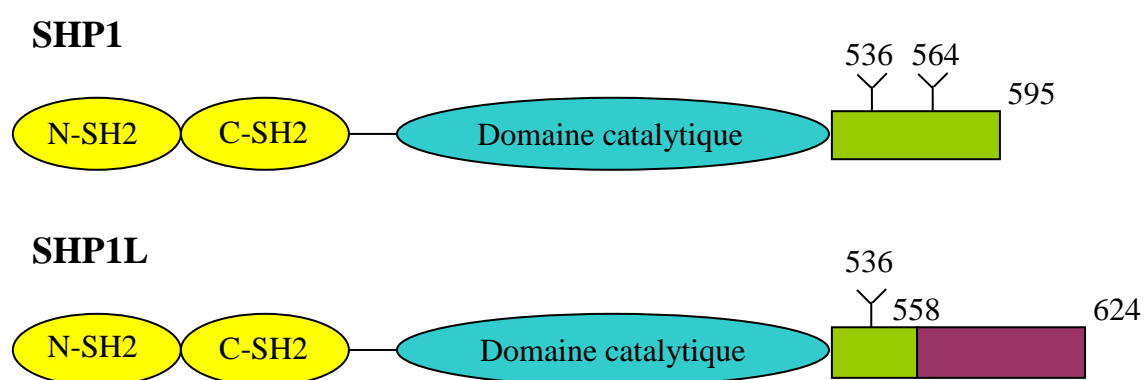
phosphorylation tyrosine C-terminaux (Tyr⁵⁴² et Tyr⁵⁸⁰) permettant leur régulation (figure 29).³²³ Les domaines SH2 gouvernent la liaison des SHPs aux résidus tyrosine phosphorylés sur d'autres protéines, contrôlant ainsi les interactions spécifiques protéine-protéine entre SHP2 et ses substrats.^{323,329} La liaison d'un peptide phosphotyrosine sur le domaine N-SH2 stimule l'activation du domaine tyrosine phosphatase de la SHP, situé à l'extrémité C-terminale et exerce une faible activité endogène.^{323,327} Des expériences de mutagenèse dirigées contre les domaines SH2, ont permis de démontrer que le domaine N-SH2 est responsable de l'inactivation des SHPs. A l'état inactif basal, le domaine N-SH2 est inséré dans la fente du domaine phosphatase catalytique créant une entrave stérique pour l'activité phosphatase (figure 29A).^{323,328,330}

Deux mécanismes d'activation des protéines SHPs ont été suggérés :

➤ Le premier mécanisme d'activation repose sur des études portant sur la structure cristallographique et les propriétés enzymatiques des SHPs. Le domaine C-SH2 reste ouvert du fait de la capture du domaine N-SH2 par le domaine phosphatase et peut se lier librement au domaine tyrosine phosphorylé sur le ligand (figure 29B). La liaison d'un ligand par l'un de ses deux résidus phospho-tyrosines sur le domaine C-SH2 de la SHP, induit l'augmentation locale de la concentration de ce ligand. Cette étape permettrait au domaine N-SH2 de se libérer de l'inhibition allostérique qu'il subit à l'état inactif, afin de se lier au deuxième résidu phospho-tyrosine du ligand, rendant alors la SHP active.^{296,328,331} Les ligands (substrats) des SHPs sont des récepteurs à activité tyrosine kinase ou des adaptateurs phosphorylés. La liaison des SHPs sur leurs ligands induirait la translocation de celles-ci du cytoplasme vers la membrane pour y exercer leur activité.

➤ Le second mécanisme d'activation est basé sur la phosphorylation de deux résidus tyrosines, Tyr⁵³⁶ et Tyr⁵⁶⁴ concernant SHP1,³³² Tyr⁵⁴² et Tyr⁵⁸⁰ concernant SHP2,³³³ situés à leur extrémité C-terminale par des protéines kinases.³³⁴ Une fois phosphorylés, ces résidus se lieraient aux domaines SH2 des SHPs. Cette liaison libère la fente catalytique du domaine phosphatase, se retrouvant maintenant capable d'exercer son activité catalytique (figure 29C).^{323,328,335}

• **Fonctions des SHPs :** Les SHPs sont directement impliquées dans diverses activités cellulaires, telles que le maintien du cytosquelette, la division et la différenciation cellulaires.³³⁶⁻³³⁸ Leur activité phosphatase a été corrélée à la régulation de la signalisation des facteurs trophiques,^{339,340} de la croissance cellulaire,³⁴¹ de l'activité de la voie des

**Figure 30 : Structure de SHP1**

Modifiée d'après Lorenz U, Immunol Rev 2009.³³⁴

MAP-Kinases Erk 1/2³⁴² et de la migration cellulaire.³⁴³ Les SHPs peuvent toutes les deux être recrutées au niveau du VEGFR2 suite à la stimulation des cellules endothéliales par le VEGFA,³⁴⁴ afin d'induire une réduction de la phosphorylation du VEGFR2 en réponse au VEGFA.^{208,318,320-322,345} Historiquement, SHP1 était connue pour jouer un rôle négatif sur les fonctions cellulaires, alors que SHP2 était connue pour jouer un rôle positif dans la transduction des processus cellulaires. Cependant à l'heure actuelle, les fonctions de chacune de ces phosphatases semblent plus complexes. Des études ont démontrées que selon le contexte cellulaire les protéines phosphatases pouvaient avoir un rôle différent. C'est pourquoi, dans la suite de ce paragraphe nous nous intéresserons aux rôles, ainsi qu'aux voies de signalisation différemment régulées par SHP1 ou SHP2 selon le contexte cellulaire.

2.5.2.3 SHP1

- **Structure :** La protéine phosphatase SHP1 (68 kDa pour 595 acides aminés), également appelée PTPN6 (autrefois également connue sous les appellations de SH-PTP1, PTP1C, HCP ou Hcph) est principalement exprimée par toutes les cellules hématopoïétiques à tous les stades de maturation, et aussi faiblement exprimée par les cellules épithéliales.³⁴⁶⁻³⁴⁹ Sa structure, typique des SHPs, se compose de deux sites d'activation par phosphorylation : Tyr⁵³⁶ et Tyr⁵⁶⁴ (figure 30). L'importance de ces deux résidus tyrosine au cours de l'activation de SHP1 a été démontrée par augmentation de l'activité PTP de SHP1 suite à la phosphorylation du site Tyr⁵³⁶ par l'insuline.³⁵⁰ Une autre étude a démontré le même phénomène suite à la phosphorylation du site Tyr⁵⁶⁴ par la protéine kinase Lyn de la famille transforming (sarcoma inducing) gene of Rous sarcoma virus (Src).³⁵¹ Il existe un variant d'épissage de SHP1 appelé SHP1L, qui diffère de SHP1 par la composition de son extrémité C-terminale.³⁵² La protéine phosphatase SHP1L a 66 acides aminés de plus que la protéine phosphatase SHP1. Les 37 derniers acides aminés de SHP1 ont été remplacés par une nouvelle séquence riche en prolines lui permettant de se lier aux protéines contenant un domaine SH3. Ainsi la SHP1L ne compte plus qu'un seul site de phosphorylation : le site Tyr⁵³⁶ (figure 30).

- **Régulation de l'activité de SHP1 :** Il existe 4 mécanismes de régulation de l'activité de SHP1 :

- Phosphorylation des résidus tyrosine de SHP1 augmentant l'activité protéase de celle-ci. Des études ont notamment démontré que la protéine kinase Src est capable de phosphoryler le résidu Tyr⁵³⁶ de SHP1 augmentant ainsi son activité phosphatase.^{353,354}

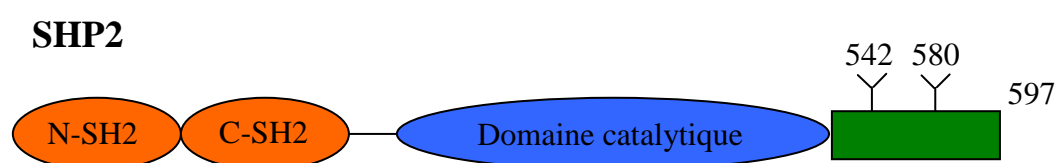


Figure 31 : Structure de SHP2

Modifiée d'après Lorenz U, Immunol Rev 2009.³³⁴

➤ Translocation cytoplasmique : il a été suggéré que la localisation cytoplasmique de SHP1 altère sa fonction, ses principales cibles étant des récepteurs membranaires.³⁵⁵

➤ Rétrocontrôle négatif exercé par les domaines SH2, permettant le maintien de SHP1 dans sa configuration inactive comme cela a été préalablement décrit.

➤ Régulation de l'expression de SHP1, qui semble être dépendante du stade de développement et du type cellulaire.

• **Rôle et signalisation de SHP1** : Les fonctions biologiques de SHP1 ont été élucidées grâce à la génération de souris dont le gène codant pour SHP1 a été invalidé. Ces animaux meurent 2 à 3 semaines après leur naissance à cause de troubles affectant toutes les lignées hématopoïétiques.³⁵⁶ Depuis cette découverte, des études utilisant des mutants dominants négatifs de SHP1 ont démontré son implication lors de la répression des événements de signalisation induits par les récepteurs aux antigènes, aux cytokines et aux facteurs de croissance.^{323,357,358} Parmi les récepteurs aux facteurs de croissance, le VEGFR2 a été démontré comme étant déphosphorylé par SHP1 suite à la stimulation par le TNF- α , aboutissant à l'inhibition de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 et de la prolifération en réponse au VEGFA.^{208,318} En 2007, le rôle anti-angiogénique de SHP1 suite à l'activation par le TNF- α a clairement été mis en évidence *in vivo* et *in vitro* par Sugano et coll.³⁴⁵ Enfin, SHP1 est également impliquée dans la déphosphorylation des récepteurs VEGFR2²⁸⁸ et FGFR1²⁸⁹ induite par le facteur TIMP2 suite à sa fixation sur l'intégrine $\alpha_3\beta_1$.

2.5.2.4 SHP2

• **Structure** : La protéine phosphatase SHP2 (68 kDa pour 597 acides aminés) est exprimée de manière ubiquitaire.²⁹⁶ Deux résidus tyrosines pouvant être phosphorylés sont retrouvés au sein de sa structure : le résidu Tyr⁵⁴² et le résidu Tyr⁵⁸⁰ (figure 31). Le résidu Tyr⁵⁴² se lierait au domaine N-SH2 tandis que le résidu Tyr⁵⁸⁰ se lierait au domaine C-SH2.³⁵⁹

• **Régulation de l'activité de SHP2** : Le résidu Tyr⁵⁴² a une importance toute particulière lors de l'activation de SHP2 du fait de sa liaison au domaine N-SH2, principal responsable de l'activité phosphatase. Une étude a ainsi démontré que le résidu Tyr⁵⁴² est le site majeur de phosphorylation de SHP2 *in vivo*.³³³ Cette phosphorylation peut être induite suite à l'activation de récepteurs tyrosine kinase tels que le PDGFR,³⁶⁰ l'EGFR et le VEGFR^{344,361} mais aussi par des protéines adaptatrices telles que Src,³²⁵ Grb2, Jak 2, la sous unité p85 de la PI3K et les ligands associés à Grb2 (Grb2-associated binder : Gab1 et 2).^{323,329}

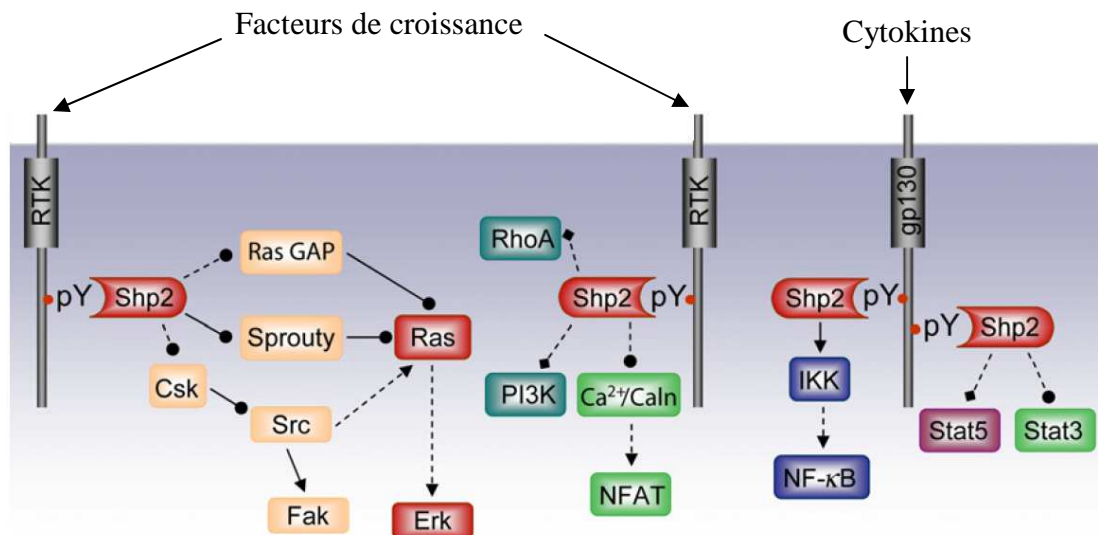


Figure 32 : Voies de signalisation induites par SHP2

Modifiée d'après Grossmann KS *et al.*, Adv Cancer Res 2010.³³⁰

- inhibition
- activation
- ◆ inhibition et activation
- interactions directes
- interactions indirectes

• **Rôle et signalisation de SHP2** : Si le rôle de SHP2 lors du développement est connu depuis de nombreuses années,^{362,363} son implication dans d'autres processus, tels que l'angiogenèse, émerge ces dernières années.³²⁸ La protéine phosphatase SHP2 régule de deux manières différentes la signalisation intracellulaire.

➤ Voies de signalisation régulées directement par SHP2 : la principale voie de signalisation activée par SHP2 en réponse aux facteurs de croissance et aux cytokines est celle des MAP-Kinases Erk 1/2. Cette activation fait appel à différents mécanismes (figure 32) :

❖ La déphosphorylation des protéines inhibitrices de Ras (RasGap³⁶⁴ et Sprouty).^{323,328,330}

❖ L'activation de Src soit directement par déphosphorylation de son résidu tyrosine inhibiteur (Tyr⁵²⁹)³³⁰ soit indirectement par déphosphorylation de son inhibiteur Csk.^{328,330,365}

La protéine phosphatase SHP2 joue également un rôle prépondérant lors de la régulation de la voie de signalisation de la PI3K. Cependant, ce rôle semble plus complexe que son rôle activateur de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2. En effet, différentes études suggèrent d'une part que SHP2 est capable d'activer la voie de signalisation de la PI3K en réponse au PDGF et à l'IGF-1, et d'autre part que SHP2 inhibe la voie de signalisation de la PI3K en réponse à l'EGF (figure 32).³²⁸ D'autres études ont également démontré d'une part que SHP2 inhibe les voies de signalisation des activateurs de transcription (Signal Transducers and Activators of Transcription : STAT)^{366,367} ainsi que les voies de signalisation de la famille des protéines kinases Janus (Janus Activated Kinase : JAK)³⁶⁸ et d'autre part que SHP2 active la voie de signalisation des protéines kinases FAK³⁶⁹ et du facteur nucléaire κ B (Nuclear Factor κ B : NF κ B).³⁷⁰ Ces observations suggèrent que la protéine phosphatase SHP2 aurait un rôle pro-angiogénique.

➤ Déphosphorylation de récepteurs à activité tyrosine kinase et régulation indirecte de voies de signalisation par SHP2 : Saxton et coll., ont démontré à partir d'embryon de souris mutantes pour la protéine phosphatase SHP2 que celle-ci pouvait également réduire l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 dépendante du PDGF en déphosphorylant le PDGFR β .³⁶³ Depuis, il a été démontré que le collagène de type I est capable de limiter la signalisation induite par le VEGFR2 en réponse au VEGFA dans les cellules endothéliales par un mécanisme de déphosphorylation du VEGFR2 impliquant SHP2.³²⁰ De plus, de nombreuses études ont démontré l'implication de ce mécanisme lors des effets anti-angiogéniques exercés par la dopamine suite à l'activation de son récepteur DDR2³²¹ et par la protéine Gas6 (Growth arrest-specific gene 6) suite à l'activation de son récepteur Axl.³²²

La signalisation régulée par SHP2 n'est pas uniquement importante pour la prolifération, la survie, et la migration des cellules endothéliales, mais aussi pour la migration des cellules musculaires lisses participant à l'angiogenèse. L'importance de SHP2 au cours du développement embryonnaire a été démontrée *in vivo* suite à la mort des embryons de souris homozygotes pour la délétion des exons 2 ou 3 du gène codant pour la protéine SHP2 entre E8.5 et E10.5 à cause de défauts lors de la gastrulation ou de la différenciation du mésoderme.^{371,372} Une étude comparative des embryons de souris chimériques mutées pour SHP2 ou le récepteur du FGF1 (FGFR1), a mis en évidence des similitudes concernant les problèmes de développement pour ces embryons, suggérant ainsi l'implication de SHP2 lors de la signalisation induite par le FGFR1.³⁷³ Si les études montrent une implication positive de SHP2 lors de la signalisation induite par le FGF2 *in vivo* et *in vitro*,^{363,374} SHP2 semble jouer davantage un rôle inhibiteur sur la signalisation induite par le VEGFA.³²⁰⁻³²² Il est ainsi suggéré que SHP2 pourrait avoir un rôle régulateur différent suivant le type de récepteur tyrosine kinase considéré et suivant le type de stimulus induit en amont.³²⁸ Les facteurs de croissance PDGF, IGR et FGF2 induisent son activation dans le but de médier leur action pro-angiogénique, alors que les facteurs anti-angiogéniques (dopamine, Gas6 et collagène I) activent SHP2 afin d'inhiber les voies de signalisation activées par les facteurs angiogéniques.

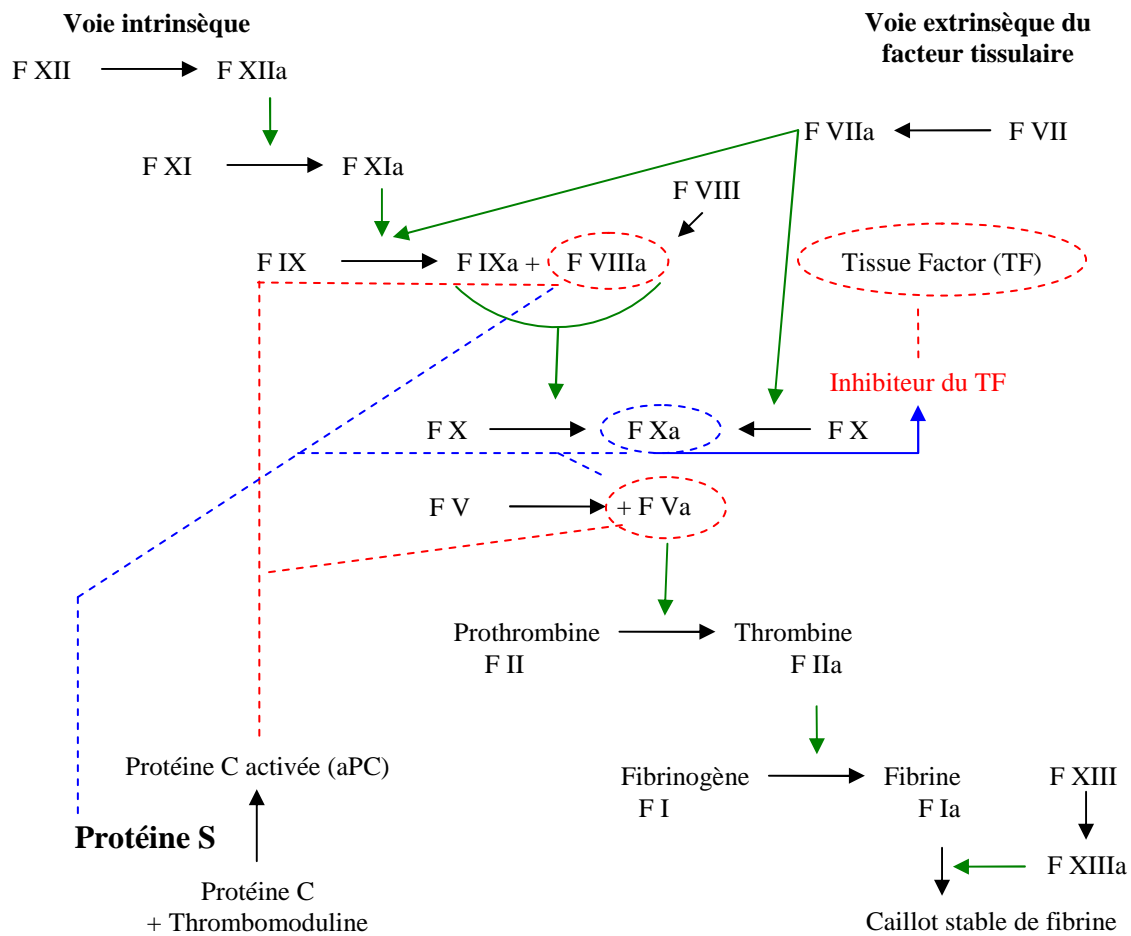


Figure 33 : Participation de la protéine S dans le système de la coagulation

- activation
- - - inhibition de la coagulation induite par la protéine C activée (aPC)
- - - inhibition de la coagulation induite par la protéine S indépendamment de la protéine C

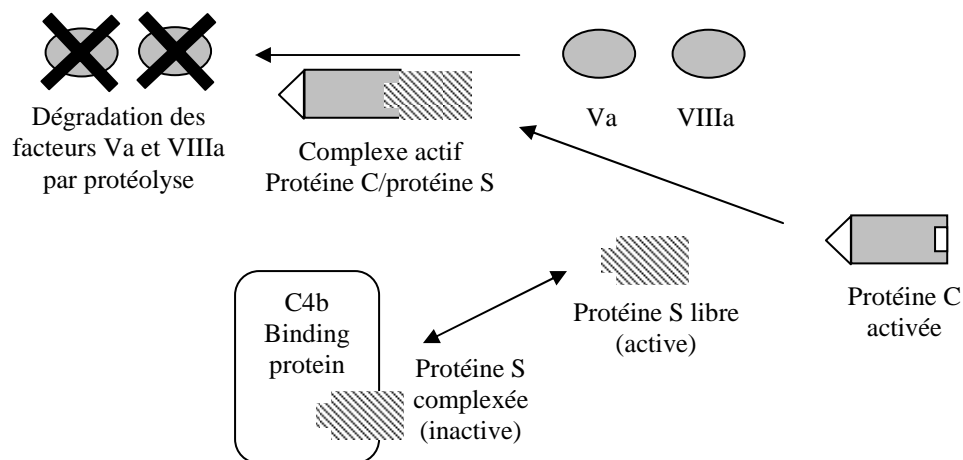


Figure 34 : C4b-BP et activité anticoagulante de la protéine S

Chapitre 3 : La protéine S et ses récepteurs

1 La protéine S

1.1 Découverte et rôle historique

C'est en 1977, trois ans après la découverte des acides γ -carboxy-glutamiques par Stenflo et coll.,³⁷⁵ que Di Scipio et coll. identifient une nouvelle protéine dépendante de la vitamine K qu'ils nomment Protéine S.³⁷⁶ L'origine du terme protéine S provient du lieu de sa découverte : Seattle. Trois ans plus tard Walker et coll. décrivent la fonction anticoagulante de la protéine S, en agissant en tant que cofacteur pour l'activation de la protéine C elle-même à l'origine de la dégradation du facteur coagulant Va (figure 33).³⁷⁷ Bien plus tard, en 1994, Dahlbäck et coll. mettent en évidence la dégradation du facteur VIIIa par la protéine C activée (aPC) dont l'activation nécessite la contribution synergique de la protéine S et du facteur V (figure 33).³⁷⁸ Entre temps, en 1981, Björn Dahlbäck et Johan Stenflo mettent en évidence la présence de deux formes circulantes de la protéine S, une forme libre et une forme liée à la protéine C4b-binding protein (C4b-BP), une protéine régulatrice de la cascade d'activation du système du complément.³⁷⁹ Cinq ans plus tard, Björn Dahlbäck démontre que seule la forme libre de la protéine S participe à l'activation de la protéine C.³⁸⁰ Chez l'Homme, la protéine S est présente dans le plasma à la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ (ou 330 nM)³⁸¹ avec une demi-vie de 42 h.³⁸² La protéine S circule dans le plasma sous forme libre pour 30 à 40% et sous forme liée de manière non covalente et réversible à la protéine C4b-BP,^{379,381,383-386} pour 60 à 70%. Sous cette forme liée à la protéine C4b-BP, la protéine S n'est pas capable d'activer la protéine C.³⁸⁷ La formation du complexe C4b-BP/protéine S n'existe pas chez toutes les espèces examinées et ne semble pas universelle. Elle est retrouvée chez le rat mais n'existe pas dans le plasma de souris, de lapin ou de bœuf.^{388,389} La protéine S se lie sur la chaîne β de la protéine C4b-BP,³⁸⁵ qui est absente chez certaines espèces.^{388,390,391} La protéine C est présente sous forme inactive dans le plasma sanguin et est activée initialement par la thrombine en complexe avec la thrombomoduline, une protéine membranaire des cellules endothéliales.³⁹² La protéine C ainsi activée n'a qu'une faible activité anticoagulante et nécessite une interaction avec la protéine S libérée de la protéine C4b-BP. La protéine S forme alors un complexe zymogène/cofacteur sérine protéase actif avec la protéine C capable de dégrader les facteurs de la coagulation Va et VIIIa (figure 34).

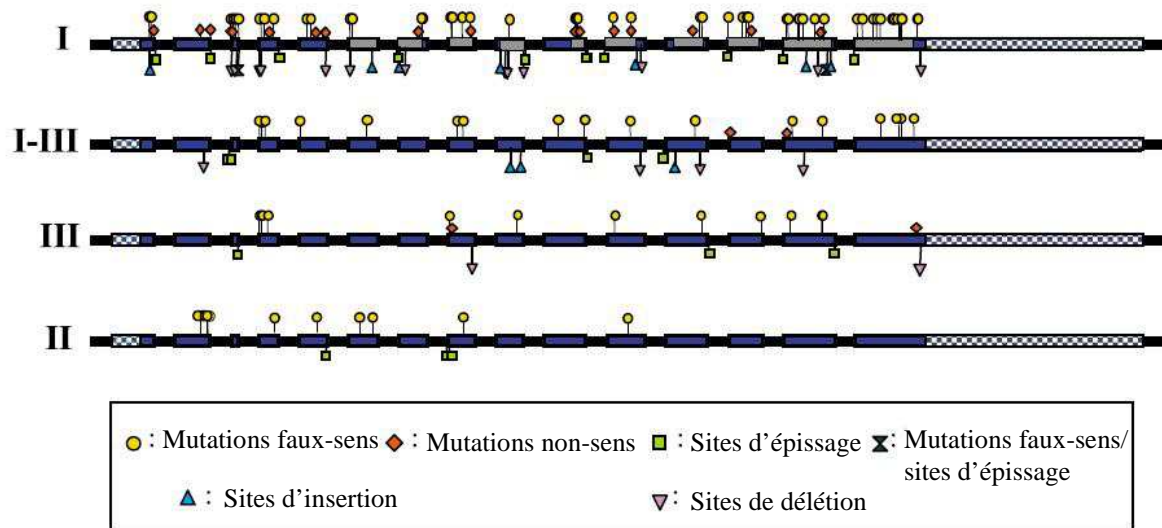


Figure 35 : Localisation des différentes mutations du gène *PROS1* liées à une déficience en protéine S

Modifiée d'après Garcia de Frutos P *et al.*, Thromb Haemost 2007.³⁸⁹

I : Classe de mutations de type I, induisant une diminution de l'antigène total protéine S et de la forme libre de la protéine S.

II : Classe de mutations de type II, dite de déficience qualitative, caractérisée par des taux normaux d'antigène de la protéine S mais une activité réduite.

III : Classe de mutations de type III, caractérisée par un taux faible de protéine S libre mais un taux de protéine S total normal.

La protéine S peut également avoir une activité anticoagulante directe, indépendante de la protéine C, par liaison et inhibition des facteurs Xa, Va et VIIIa³⁹³⁻³⁹⁶ ou en augmentant la capacité des inhibiteurs du Tissue Factor (TF) à inhiber la formation du complexe FVIIa/TF (figure 33).^{397,398} Cependant mise à part une étude relatant le rôle anti-thrombotique de la protéine S humaine indépendamment de la protéine C chez le primate,³⁹⁹ le rôle anticoagulant de la protéine S indépendamment de l'activation de la protéine C *in vivo* reste un sujet de débat.

1.2 Déficiences en protéine S

L'importance de la protéine S en tant que facteur anticoagulant est bien illustrée par la mort *in utero* des souris homozygotes déficientes pour le gène codant pour la protéine S (*PROS1*), ainsi que par les manifestations cliniques observées chez les rares patients homozygotes et hétérozygotes présentant des déficiences sévères en protéine S. Des affections potentiellement mortelles telles que le purpura fulminans et la Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée (CIVD) sont observées dans la période néonatale chez ces patients.⁴⁰⁰ Les individus hétérozygotes déficients en protéine S présentent des affections moins graves, mais fortement associées à un risque accru d'événements thromboemboliques. Alors que certains sujets déficients en protéine S ne connaîtront pas de problèmes de thrombose et resteront asymptomatiques, d'autres patients souffrent souvent de thromboses veineuses récidivantes profondes et d'embolies pulmonaires à l'âge adulte, ce qui nécessite un traitement anti-coagulation à long terme. En accord avec la nature multifactorielle de ces pathologies thromboemboliques, une liste de facteurs de risques génétiques a été élaborée.⁴⁰¹ La déficience en protéine S peut être acquise notamment via une diminution transitoire du taux de protéine S, comme cela a pu être observé lors de plusieurs états physiopathologiques tels que les thérapies à bases d'antagonistes de la vitamine K, la prise orale de contraceptifs, la grossesse, des pathologies du foie, des syndromes néphrotiques, des CIVD, des pathologies auto-immunes, et des infections.⁴⁰² Néanmoins, la déficience en protéine S caractérisée par des taux faibles persistants en protéine S a généralement une origine génétique. Une attention particulière est portée sur la déficience en protéine S héréditaire et la recherche des porteurs potentiels de mutations du gène *PROS1* dans les familles avec des manifestations thrombotiques. A l'heure actuelle plus de 200 mutations du gène *PROS1* ont été rapportées dans la littérature (figure 35).^{389,403} Seulement 30% d'entre elles ont été étudiées *in vitro*, afin de mieux comprendre les bases moléculaires de la déficience en protéine S et ses relations structure / fonction.³⁸⁹

Souris sauvages (+/+)

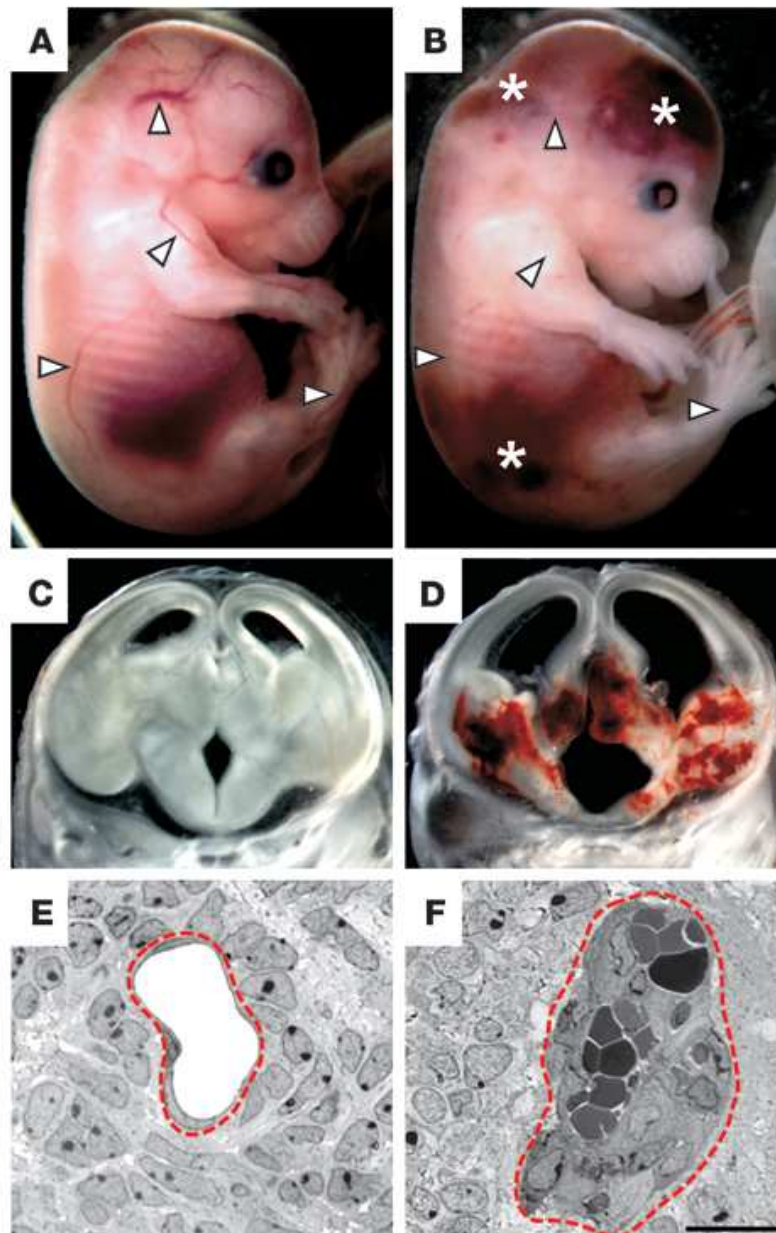
Souris déficientes *PROS1* (-/-)

Figure 36 : Phénotype des souris Knock Out pour le gène *PROS1* (-/-)

Modifiée d'après Burstyn-Cohen T *et al.*, J Clin Invest 2009.⁴⁰⁴

(A et B) Observation macroscopique des embryons de souris à E 17.5, les astérisques montrent les zones hémorragiques et les têtes de flèche montrent les vaisseaux sanguins ayant régressé.

(C et D) Photographies de coupes de cerveau (300 μm). La perfusion permet l'observation de zones claires chez les individus sauvages (+/+) (C) moins importantes chez les individus déficients présentant aussi de larges zones hémorragiques (-/-) (D).

(E et F) Photographie de capillaires drainés par la perfusion chez les individus +/+ (E) ou obstrués par les thromboses chez les individus -/- (F). Barre d'échelle 20 μm.

La génération de souris déficientes pour la protéine S souligne l'importance du rôle de cette protéine au cours de la coagulation et du développement embryonnaire. Les embryons de souris homozygotes pour cette délétion (-/-) meurent à E 17.5 à cause de coagulopathies fulgurantes associées à d'importantes hémorragies intracrâniennes (figure 36).^{400,404} Les individus hétérozygotes (+/-) présentent quant à eux des troubles thrombotiques et des défauts de développement vasculaire mais parviennent à terme, reproduisant ainsi les observations réalisées chez les patients humains.^{400,404} Des défauts de vascularisation similaires ont été retrouvés chez les souris dont le gène *PROS1* a été invalidé spécifiquement dans les cellules musculaires lisses.⁴⁰⁴ De plus, les souris mutantes dont le gène *PROS1* a été invalidé spécifiquement dans les cellules hépatiques (supposées être la principale source de protéine S), sont viables et présentent des coagulopathies moins sévères que les individus hétérozygotes, ainsi qu'une absence de troubles vasculaires. Enfin, la délétion spécifique du gène *PROS1* dans les cellules endothéliales indique que celles-ci participent fortement à la présence de la protéine S circulante.⁴⁰⁴

1.3 Gène et synthèse

Le génome humain contient deux gènes codants pour la protéine S (*PROS1* et *PROSP*), néanmoins seul le gène *PROS1* (GeneID : 5627 ; MIM # 176880) est exprimé, tandis que *PROSP* (GeneID : 5628) agit comme un pseudogène. Les deux gènes codants pour la protéine S sont localisés sur des sites proches mais différents dans la région du centromère du chromosome 3 : *PROS1* sur l'allèle q11.2 et *PROSP* sur l'allèle p21-cen. De plus, les exons composants ces deux gènes présentent de fortes homologues de séquence (97%). Le gène *PROS1* contient 15 exons pour 14 introns et mesure 101 kb, pour un ARNm de 3,3 kb après transcription. Le génome des chimpanzés et des gorilles présente également les deux gènes codants pour la protéine S, comme celui de l'Homme, alors que celui des orang-outans ne contient qu'un seul gène codant pour la protéine S. Ces observations suggèrent qu'une duplication de ce gène a eu lieu après l'embranchement phylogénétique entre les orang-outans et les singes d'Afrique *Apes*.⁴⁰⁵

La protéine S circulante dans le plasma est principalement d'origine hépatique⁴⁰⁶ et endothéliale.^{404,407} Elle est également synthétisée par les macrophages,⁴⁰⁸ les cellules de Leydig, les ostéoblastes⁴⁰⁵ et les cellules musculaires lisses vasculaires.⁴⁰⁹

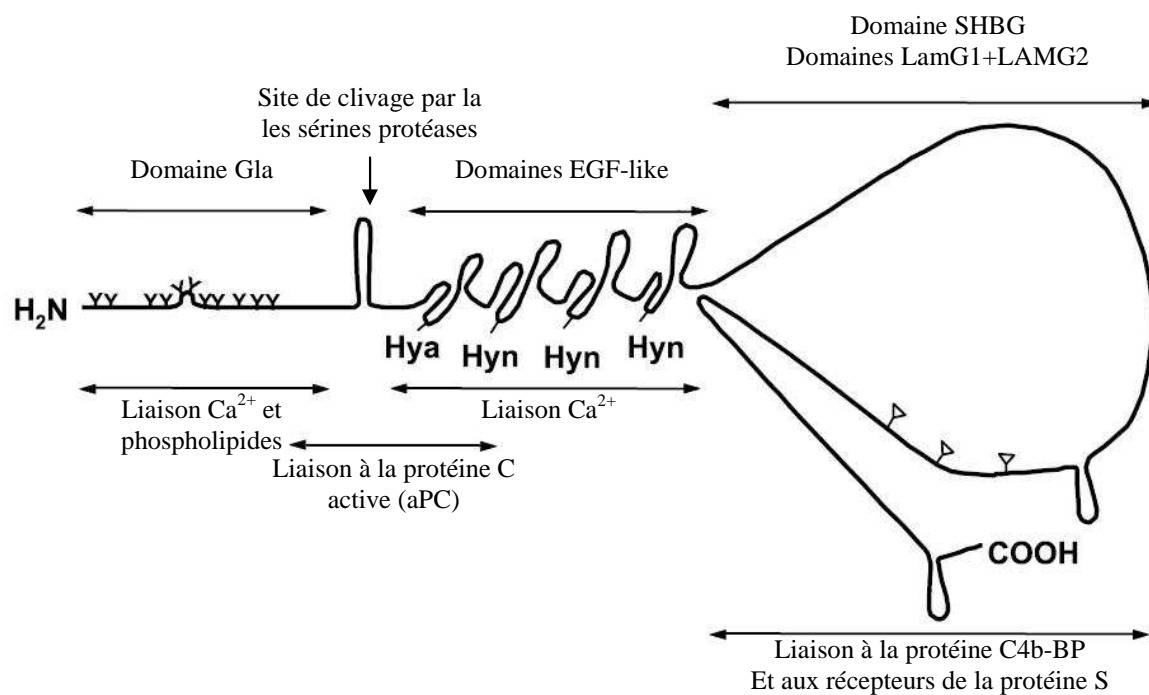


Figure 37 : Structure schématique de la protéine S humaine

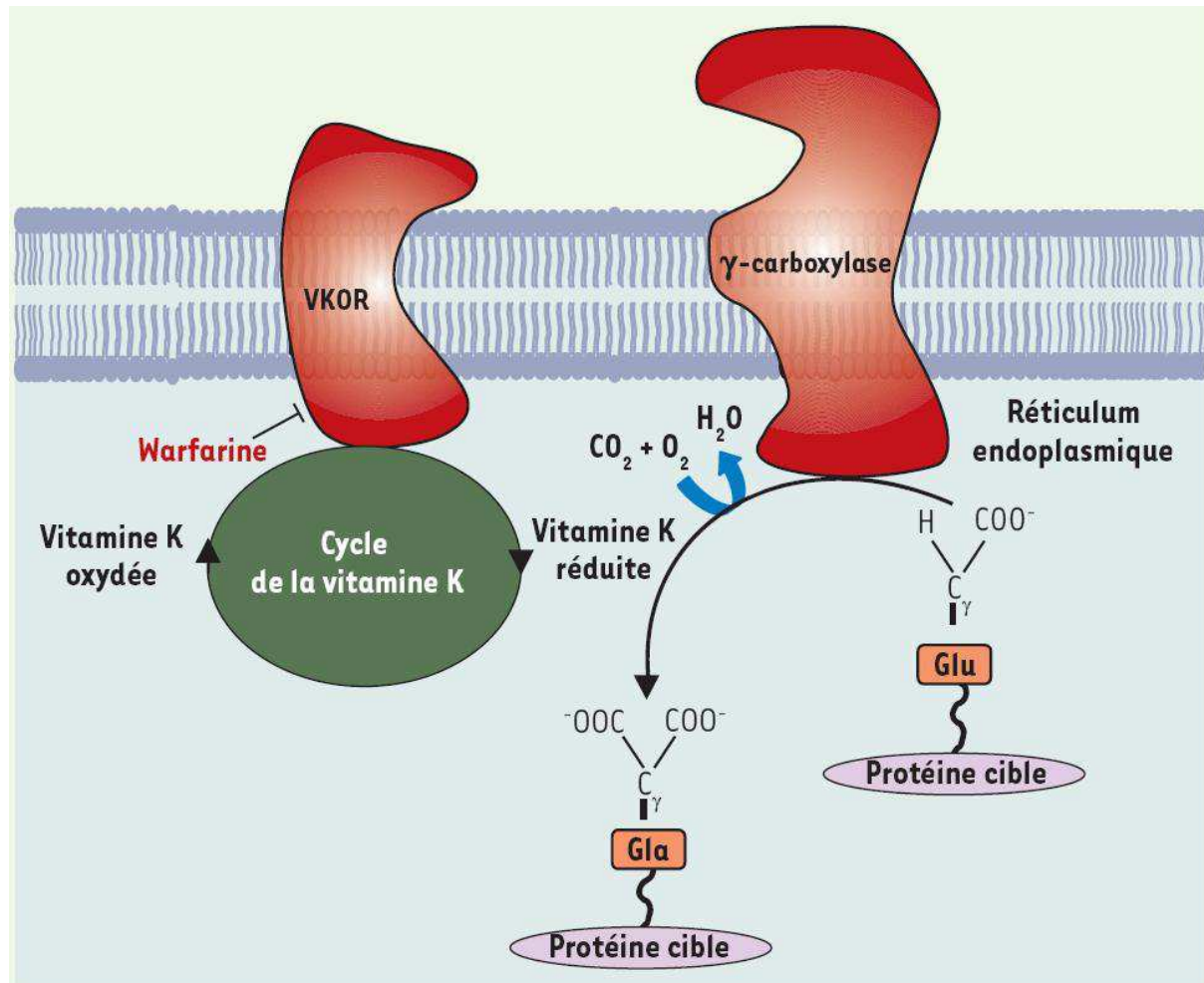
Modifiée d'après Dahlback B, Thromb Haemost 2007.⁴⁰⁵

1.4 Structure protéique

La protéine S humaine est une glycoprotéine composée d'une simple chaîne contenant 635 acides aminés lui conférant une masse moléculaire de 70,69 kDa.⁴¹⁰⁻⁴¹² La protéine S mature suite une modification post-traductionnelle, comporte 3 chaînes carbohydrates liées au domaine N-terminal et des acides aminés modifiés : des acides γ -carboxy glutamiques (Gla), des acides β -hydroxy aspartiques (Hya) et des β -hydroxy asparagines (Hyn) (figure 37). La protéine S se compose de multiples domaines décrits ci après à partir de l'extrémité N-terminale :

- Un domaine Gla de liaison au Ca^{2+} suivi d'un site de clivage par la thrombine
- Quatre domaines EGF (Epidermal Growth Factor)-like
- Un domaine C-terminal de liaison à la protéine C4b-BP ainsi qu'à ses récepteurs à activité tyrosine kinase appelé domaine Sex-Hormone-Binding Globulin (SHBG) constitué lui-même de deux domaines Laminine G (LamG) (figure 37).^{405,410-412}

L'organisation du gène *PROS1* en introns/exons corrèle parfaitement avec les domaines structuraux de la protéine S suggérant son évolution à partir d'une combinaison de brassage d'exons et de duplications. Le domaine Gla possède une forte affinité pour les phospholipides membranaires chargés négativement lui conférant un rôle central lors de la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages.⁴⁰⁸ Ce domaine interagit aussi avec l'aPC afin de former un complexe actif lors de l'inhibition de la cascade de la coagulation.⁴¹³⁻⁴¹⁵ La protéine S humaine possède ensuite un site de clivage pour les sérines protéases telles que la thrombine qui est capable de cliver la protéine S à différents endroits (Arg⁴⁹ et Arg⁷⁰), mais aussi le facteur Xa (lui-même régulé par la protéine S) capable de la cliver l'Arg⁶⁰, laissant le domaine Gla attaché à la protéine S par un pont disulfure. Ce site de clivage est également impliqué dans la formation du complexe Protéine S/aPC puisqu'une fois la protéine S clivée, la formation du complexe est perdue.^{411,412} Les domaines EGF-like 1 et 2 sont importants pour l'activité du complexe Protéine S/aPC, le domaine EGF-like 1 se liant directement à l'aPC. De manière générale, les domaines EGF-like ont aussi une forte affinité pour le Ca^{2+} notamment le domaine EGF-like 4 (Kd inférieur à 1 nM). Cette fixation du Ca^{2+} serait importante pour le bon repliement de la protéine S.^{416,417} Les deux domaines LamG composant le domaine SHBG représentent la moitié de la protéine S. Ces deux domaines permettent la liaison à la protéine C4b-BP ainsi qu'à des récepteurs à activité tyrosine kinase nommés Tyro3, Axl et Mer.⁴¹⁰⁻⁴¹² Le domaine LamG2 est quant à lui connu pour jouer un rôle dans le clivage des facteurs Va et VIIIa médiés par le complexe protéine S/aPC.^{411,412}

Figure 38 : La réaction de γ -carboxylationBenzakour O *et al.*, Med Sci (Paris) 2007.⁴¹⁰

1.5 Régulation post-traductionnelle : une protéine γ -carboxylée

La sécrétion et l'activité biologique de la protéine S sont dépendantes d'une réaction post-traductionnelle appelée γ -carboxylation.^{418,419} Cette réaction post-traductionnelle, qui a lieu dans le réticulum endoplasmique, consiste en la substitution d'un atome d'hydrogène par un groupement carboxyle (COO^-) sur le carbone γ d'un acide glutamique (Glu) d'une protéine cible, le transformant ainsi en acide γ -carboxyglutamique (domaine Gla) (figure 38).⁴¹⁹ L'enzyme catalysant cette réaction s'appelle la γ -glutamyl carboxylase (γ -carboxylase, d'où le nom de cette réaction) et requiert comme cofacteur la vitamine K sous forme réduite (hydroquinone). La réaction de γ -carboxylation ainsi réalisée engendre un résidu γ -carboxyglutamique ainsi que de la vitamine K sous forme oxydée.⁴¹⁰ Afin d'entretenir et de perpétuer cette réaction, la vitamine K oxydée doit de nouveau être réduite. Cette réaction est réalisée par la vitamine K 2,3-époxyde réductase (VKOR) dont l'activité peut être inhibée par la warfarine. La VKOR et la γ -carboxylase sont localisées à la membrane du réticulum endoplasmique et fonctionnent à la manière d'un assemblage supra moléculaire de protéines afin d'entretenir la réaction de γ -carboxylation. La protéine chaperone caluménine peut inhiber la réaction de γ -carboxylation en se liant physiquement à la γ -carboxylase inhibant son activité⁴²⁰ ainsi qu'en sensibilisant la VKOR à la warfarine.^{419,421} Les protéines subissant cette modification post-traductionnelle, dépendante de la vitamine K, sont nommées protéines vitamine K-dépendantes (PVKDs).⁴¹⁹ La γ -carboxylation des PVKDs nécessite, afin de débiter, la fixation de la γ -carboxylase sur la séquence consensus suivante caractéristique de ces protéines : acide aminé hydrophobe-Phe (phénylalanine)-X-X-X-X-Ala (Alanine) où X représente un acide aminé quelconque.^{410,418} Les PVKDs, dont fait partie la protéine S, regroupent 14 membres principalement impliqués dans la cascade de la coagulation (tableaux 3 et 4). Au sein de cette famille, se trouve une PVKD bien particulière, la protéine Gas6. Cette dernière est un homologue structural de la protéine S avec lequel elle partage non seulement la même structure, à l'exception du site de clivage par les sérines protéases, mais aussi 44% d'homologie de séquence ainsi que la capacité de se lier aux récepteurs à activité tyrosine kinase Tyro3, Axl et Mer.^{410,422,423}

| Facteur | Lieu de synthèse | Fonction dans la coagulation du sang |
|----------------------------|------------------|--|
| Prothrombine ou facteur II | Foie | Zymogène du FIIa procoagulant, la thrombine active le FVIII |
| Facteur VII | Foie | Zymogène du FVIIa procoagulant activé par FIIa. Active les FIX et X. |
| Facteur IX | Foie | Zymogène du FVIIa procoagulant activé par le FIIa. Active les FIX et X. |
| Facteur X | Foie | Zymogène du FXa procoagulant activé par FVIIa et IXa. Active le facteur II. |
| Protéine C | Foie | Zymogène de la protéine C activée anticoagulante. Inactive les FVa et VIIIa. |

Tableau 3 : Protéines vitamine K-dépendantes avec activité protéolytique
Benzakour O *et al.*, Med Sci (Paris) 2007.⁴¹⁰

| Protéine | Lieu de synthèse | Fonctions et effets cellulaires |
|----------------------|---|--|
| Protéine Z | Foie | Absence d'effets cellulaires, cofacteur dans l'inhibition du FXa |
| Protéine S | Foie, cerveau, cœur, ovaire, placenta, rate, rein, cellules endothéliales, mégacaryocytes, ostéoblastes, cellules du système nerveux, cellules vasculaires lisses et cellules de Leydig | Cofacteur de la protéine C. Stimule la résorption osseuse. Participe à la phagocytose des cellules apoptotiques et au <i>shedding</i> des photorécepteurs rétiniens |
| Gas6 | Cœur, cerveau, poumons, estomac, rein, intestin, rétine, testicules (cellules de Leydig et cellules de Sertoli), pancréas, os (ostéoclastes et ostéoblastes) et cellules endothéliales | Stimule la survie, la prolifération, la migration, l'adhésion cellulaires ainsi que la résorption osseuse. Participe à la reconnaissance et à la phagocytose des cellules apoptotiques et au <i>shedding</i> des photorécepteurs rétiniens |
| MGP | Cellules vasculaires du muscle lisse et chondrocytes | Inhibiteur de la calcification de la matrice extracellulaire |
| BGP/ Ostéocalcine | Ostéoblastes et odontoblastes | Inhibiteur de la formation osseuse |
| TMG3 TMG4 | ARNm : cerveau et cœur pour TMG3 et rein et pancréas pour TMG4 | inconnu |
| PRGP1 PRGP2 | ARNm : placenta et pancréas pour PRGP1 et PRGP2 et rein pour PRGP2 | inconnu |

Tableau 4 : Protéines vitamine K-dépendantes avec ou sans activité protéolytique
Benzakour O *et al.*, Med Sci (Paris) 2007.⁴¹⁰

1.6 Nouvelles fonctions de la protéine S

La découverte de la sécrétion de la protéine S par d'autres organes que le foie suggère que celle-ci pourrait avoir d'autres fonctions que son rôle historique décrit dans la cascade de la coagulation sanguine. Des études ont ainsi montré son implication lors de la réponse inflammatoire *in vivo*, lors de chocs septiques, suggérant qu'elle exercerait des propriétés anti-inflammatoires.^{412,424,425} Des études récentes ont démontré par ailleurs, que la protéine S protège les neurones de l'apoptose dans un modèle de lésion ischémique/hypoxique murin⁴²⁶, qu'elle induit la prolifération des cellules musculaires lisses,^{409,427,428} et qu'elle inhibe la prolifération des lymphocytes T⁴²⁹ et des astrocytes.⁴³⁰ Grâce à la fixation via son domaine Gla sur les phospholipides membranaires négativement chargés, la protéine S induit la phagocytose des cellules apoptotiques.^{431,432} La surexpression de la protéine S dans des cas de cancers humains pulmonaires⁴³³ et colorectaux,⁴³⁴ suggère également son implication au cours de la croissance tumorale. Les problèmes de développements vasculaires rencontrés chez les souris déficientes en protéine S appuient également l'hypothèse selon laquelle la protéine S aurait une implication autre que celle rencontrée dans la coagulation sanguine.^{400,404}

De plus, la découverte de récepteurs à activité tyrosine kinase pour la protéine S et son homologue structural Gas6, nommés TAM pour Tyro3, Axl et Mer, a grandement fait évoluer l'idée de nouvelles fonctions de la protéine S.⁴³⁵ Depuis la découverte de ces récepteurs, de nombreuses nouvelles fonctions lui ont été associées. L'activation des récepteurs TAM par la protéine S induit la protection des neurones,^{436,437} la phagocytose,^{438,439} la résistance des cellules endothéliales à l'apoptose⁴⁴⁰ et la résorption osseuse.⁴⁴¹

2 Les récepteurs TAM de la protéine S

La protéine S et la protéine Gas6 sont à l'heure actuelle les deux seuls ligands connus de la famille de récepteurs à activité tyrosine kinase nommés récepteurs TAM, pour **Ty**ro3, **A**xl et **M**er.^{410,435} L'affinité de la protéine S et de la protéine Gas6 pour chacun des récepteurs TAM varie d'une espèce à l'autre.⁴²⁴ Ainsi la protéine Gas6 humaine présente une affinité 3 à 10 fois supérieure pour les récepteurs Tyro3 et Axl (2,7 nM et 0,4 nM respectivement) que pour le récepteur Mer (29 nM).^{442,443} Alors que l'activation des récepteurs TAM par la protéine Gas6 est bien connue, l'activation des récepteurs TAM par la protéine S reste discutée.⁴⁴²⁻⁴⁴⁵ Cependant, des études ont démontré que la protéine S active le récepteur Mer dans la rétine⁴⁴⁶ et les macrophages,^{438,439} le récepteur Tyro3 dans les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique⁴⁴⁰ et les neurones.^{436,437} La protéine S active à la fois le récepteur Mer et le récepteur Tyro3 dans l'épithélium pigmentaire de la rétine.⁴⁴⁷ Aucune étude n'a pour le moment démontré que la protéine S est un ligand pour le récepteur Axl. L'élucidation des voies de signalisation activées par les récepteurs TAM a permis de démontrer leur implication au cours de divers processus cellulaires tels que la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages, l'agrégation plaquettaire ou encore la différenciation des cellules immunitaires.⁴⁴⁸

| Récepteur | Synonymes |
|--------------|--|
| Tyro3 | Humain : Rse, Sky, Tif Souris : Brt, Dtk, Etk-2 Poulet : Rek |
| Axl | Humain : Ufo Souris : Ark Rat : Tyro7 |
| Mer | Humain : MerTK, Nyk Rat : Tyro12 Poulet : Eyk |

Tableau 5 : Nomenclature des récepteurs Tyro3, Axl et Mer

2.1 Nomenclature

Au début des années 1990, chacun des gènes codant pour les récepteurs TAM a été cloné à partir de nombreuses espèces par des groupes indépendants générant une confusion générale de leur nomenclature (tableau 5). Le récepteur Axl (également appelé Ark, Ufo, Tyro-7) fut le premier découvert par Liu et coll. en 1988, chez deux patients souffrant de leucémie myéloïde chronique.⁴⁴⁹ Trois ans plus tard, d'autres groupes clonent simultanément ce même gène. Chez des patients souffrant de troubles myéloprolifératifs ce gène est nommé alors Ufo,⁴⁵⁰ alors que chez la souris il est nommé Ark.⁴⁵¹ La même année, 13 nouveaux fragments de PCR comprenant 50 à 60 acides aminés d'un domaine à activité tyrosine kinase conservé sont isolés à partir d'extraits de cerveau de rat et nommés Tyro1 à 13.⁴⁵² Les auteurs regroupent alors les récepteurs Tyro3, Tyro7 et Tyro12 au sein de la même sous famille en se basant uniquement sur la séquence en acides aminés de leur domaine tyrosine kinase. Plus tard, des études montreront que le gène Tyro7 est identique au gène Axl, que le gène Tyro12 est identique au gène Mer et que Tyro3 constitue le troisième et dernier membre de la famille des récepteurs TAM.

En 1992, un second membre de la famille des récepteurs TAM est identifié à partir du rétrovirus de poulet RLP30, il s'agit du récepteur Mer (également appelé Eyk, MerTK, Nyk ou Tyro12) et baptisé v-ryk⁴⁵³ puis rebaptisé v-eyk pour éviter la confusion avec une autre protéine kinase.⁴⁵⁴ Plus tard au cours de la même année, le même gène humain est cloné par une autre équipe à partir d'une librairie d'expression de cellules B-lymphoblastoïdes et appelé c-mer en raison de sa découverte à la fois dans des monocytes, des cellules épithéliales et reproductrices.⁴⁵⁵ La même année une autre équipe clone le même gène humain et le nomme Nyk pour NCAM-related tyrosine kinase.⁴⁵⁶ Enfin, en 1999, une autre équipe localise le gène codant pour ce récepteur chez l'Homme et le renomme MerTK pour Mer tyrosine kinase.⁴⁵⁷

Le dernier membre de cette famille, Tyro3 (également appelé Brt, Dtk, Rse, Sky, Tif, Etk2 ou Rek), mis en évidence pour la première fois en 1991 par Lai et coll., a été lui aussi cloné à partir de bibliothèques d'ADN complémentaires provenant de différentes espèces et s'est vu attribuer différents noms avant de revenir à sa première dénomination : Tyro3.⁴⁵²

Aujourd'hui les noms les plus couramment utilisés dans la littérature pour désigner ces récepteurs sont Tyro3, Axl et Mer (ou MerTK).

2.2 Expression

Les gènes codant pour ces différents récepteurs ont des structures proches, 19 exons pour Mer et 20 exons pour Axl et Tyro3, transcrits en ARNm de 3000 à 5000 paires de bases selon le site d'épissage utilisé.⁴⁴⁸ Ces gènes sont localisés sur des chromosomes distincts : Tyro3 est localisé sur le chromosome 15 (15q15.1-q21.1), Axl sur le chromosome 19 (19q13.1) et Mer sur le chromosome 2 (2q14.1). Les protéines ont des structures similaires mais une séquence différente, 890 acides aminés pour Tyro3, 894 acides aminés pour Axl et 999 acides aminés pour Mer, partageant 54 à 59% d'homologie pour leur partie cytoplasmique.⁴⁵⁸ Après maturation, les protéines ont des poids moléculaires différents variant de 100 à 140 kDa pour Axl et Tyro3 et de 165 à 205 kDa pour Mer selon leur état de glycosylation,^{448,459} bien décrit pour Axl⁴⁶⁰ et Mer.^{461,462}

Si de nombreuses équipes ont rapporté l'expression de l'ARNm des récepteurs TAM dans les tissus embryonnaires,^{452,458,463,464} la viabilité et l'absence de défauts développementaux à la naissance des souris simple, double et triple déficientes pour les récepteurs TAM, montre que ceux-ci ne sont pas essentiels au développement embryonnaire. Lors de la vie adulte, les récepteurs TAM présentent une distribution étendue, pouvant se chevaucher, mais présentent le plus souvent des profils d'expression uniques.

- Tyro3 est principalement et abondamment exprimé dans le système nerveux mais son expression est également retrouvée dans les ovaires, les testicules, les glandes mammaires, les poumons, les reins, les ostéoclastes la rétine et un grand nombre de cellules de la lignée hématopoïétiques tels que les monocytes/macrophages et les plaquettes.^{408,448}

- Axl est quant à lui exprimé de manière ubiquitaire,⁴⁶⁵ mais à des taux plus élevés dans l'hippocampe et le cervelet,⁴⁶⁶ ainsi que dans les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les plaquettes, les cellules endothéliales, le cœur, les muscles squelettiques, le foie, les reins et les testicules.^{410,448,459}

- Mer est exprimé dans les cellules de la lignée hématopoïétique, telles que les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les mégacaryocytes et les plaquettes.^{455,467,468} De forts niveaux d'expression de Mer sont aussi détectés dans les ovaires, les testicules, la prostate, les poumons, la rétine et les reins. Des niveaux d'expression faibles de Mer sont retrouvés dans le cœur, le cerveau et les muscles squelettiques.^{408,410,448,459}

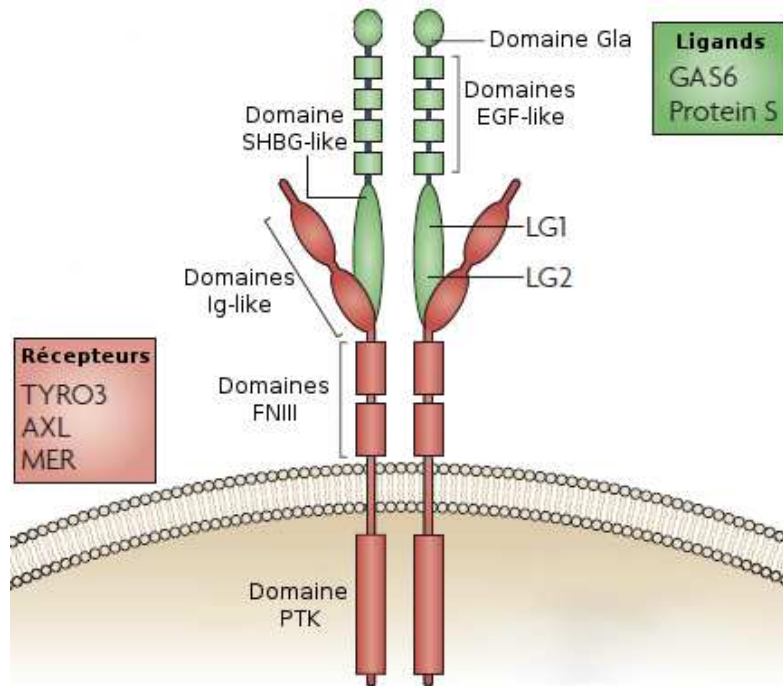


Figure 39 : Structure des récepteurs TAM

Modifiée d'après Lemke G et Rothlin CV, Nat Rev Immunol 2008.⁴⁰⁸

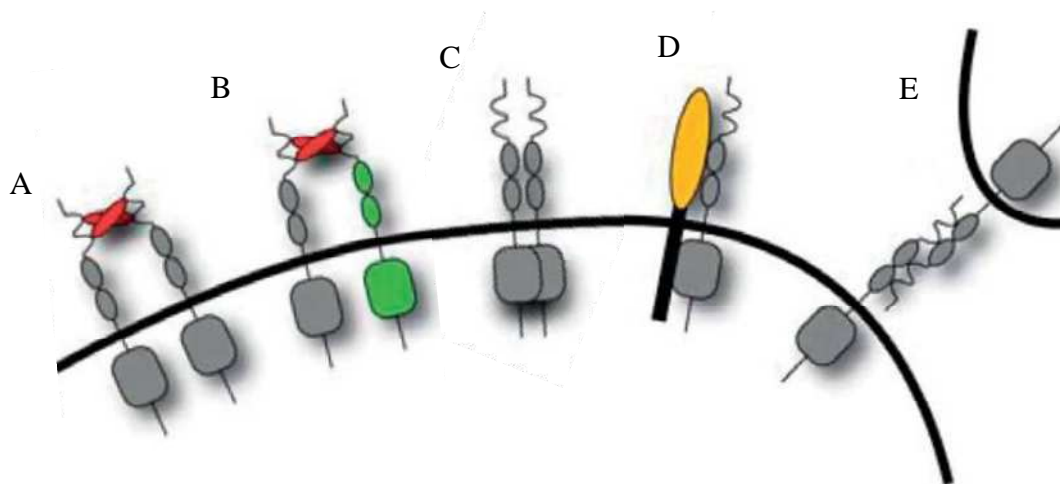


Figure 40 : Mode d'activation des récepteurs TAM

Modifiée d'après Linger RM *et al.*, Adv Cancer Res 2008.⁴⁴⁸

- (A) Activation homo-dimérique des récepteur TAM par leurs ligands.
- (B) Activation hétéro-dimérique des récepteur TAM par leurs ligands.
- (C) Auto activation homo-dimérique des récepteur TAM indépendante de leurs ligands.
- (D) Activation hétérotopique-dimérique des récepteurs TAM indépendante de leurs ligands.
- (E) Activation intercellulaire des récepteurs TAM indépendante de leurs ligands.

Les récepteurs TAM ont également été retrouvés surexprimés dans de nombreux cas de cancers parfois de manière associée : Axl et Tyro3 sont tous les deux surexprimés dans des cas de leucémies, Axl et Mer sont tous les deux surexprimés dans des cas de mélanomes, de cancers mammaires, de cancers de la prostate, ou de cancers gastriques. Le plus souvent les récepteurs TAM présentent des profils de surexpression uniques : Axl est surexprimé seul dans certains cas de leucémies érythroïdes et megacaryocytiques, de cancers du col de l'utérus, de cancers colorectaux, de cancers de la thyroïde, de cancers pulmonaires, de carcinomes rénaux, d'ostéosarcomes et de glioblastomes. Mer est surexprimé seul dans des cas de leucémies lymphoïdes, de lymphomes à cellules du manteau, d'adénomes de la glande pituitaire et de rhabdomyosarcomes. Tyro3 est surexprimé seul uniquement dans des cas de myélomes.⁴⁴⁸

2.3 Structure et activation

Les récepteurs TAM possèdent un domaine extracellulaire N-terminal constitué de deux domaines Immunoglobulin-like (domaines Ig-like), de deux domaines fibronectine de type III (domaines FNIII), suivis d'un court domaine transmembranaire puis d'un domaine cytoplasmique C-terminal à activité tyrosine kinase (domaine PTK) très conservé au cours de l'évolution (figure 39).^{408,410,448,459} Ces récepteurs présentent des similarités de structure avec les récepteurs aux cytokines de classe 1 et 2. Ils sont spécifiquement apparus à l'embranchement phylogénétique des cordés et semblent être les derniers récepteurs tyrosine kinase apparus au cours de l'évolution.^{408,469}

La fixation de la protéine S et de la protéine Gas6 par leur domaine SHBG sur les domaines Ig-like d'un monomère de l'un des récepteurs TAM induit un changement de conformation puis l'homo-dimérisation de ce dernier provoquant par la suite l'autophosphorylation des résidus tyrosines de son domaine PTK (figures 39 et 40A).⁴⁷⁰ La position des résidus tyrosine autophosphorylés diffère selon le récepteur TAM considéré. L'autophosphorylation des résidus tyrosine kinase permet le recrutement de molécules adaptatrices de signalisation possédant un domaine SH2, dont la nature sera abordée par la suite pour chacun des récepteurs.⁴⁴⁸ L'activation des récepteurs TAM semble nécessiter la dimérisation préalable de leur ligands comme cela a été montré pour l'activation du récepteur Mer par la protéine S (figures 39 et 40A).⁴³⁸ Des études suggèrent que la fixation d'un ligand sur un monomère de récepteur TAM peut également induire une hétéro-dimérisation de ce dernier avec un autre récepteur TAM dans certains cas, comme cela est suggéré pour le récepteur Axl (figure 40B).^{471,472}

| Souris transgéniques | | | | | |
|--------------------------------------|--|-------------------------------------|-------------|--|--|
| Gène invalidé | Gas6 | Axl | Tyro3 | Mer | Axl/Tyro3/Mer (triple KO) |
| Système nerveux | Non exploré | Non exploré | Non exploré | Non exploré | • Anomalies neurologiques |
| Système immunitaire | • Protection contre des lésions rénales induites | • Élévation du taux d'autoanticorps | | • Défaut de phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages et les monocytes | • Désordres auto-immuns • Augmentation de l'apoptose. • Thromboses et hémorragies dans divers tissus |
| Coagulation, Agrégation plaquettaire | • Défaut d'agrégation plaquettaire | | | | Non exploré |
| Spermato-genèse | • Animaux fertiles, pas de problème apparent | | | | • Défaut de spermatogenèse (pas de sperme mature) |
| Système visuel | • Rétine normale | Non exploré | Non exploré | • Défaut de la phagocytose des photorécepteurs, dégénérescence rétinienne | |

Tableau 6 : Phénotype associé à l'invalidation des récepteurs TAM chez la souris

Benzakour O *et al.*, Med Sci (Paris) 2007.⁴¹⁰

Tyro3

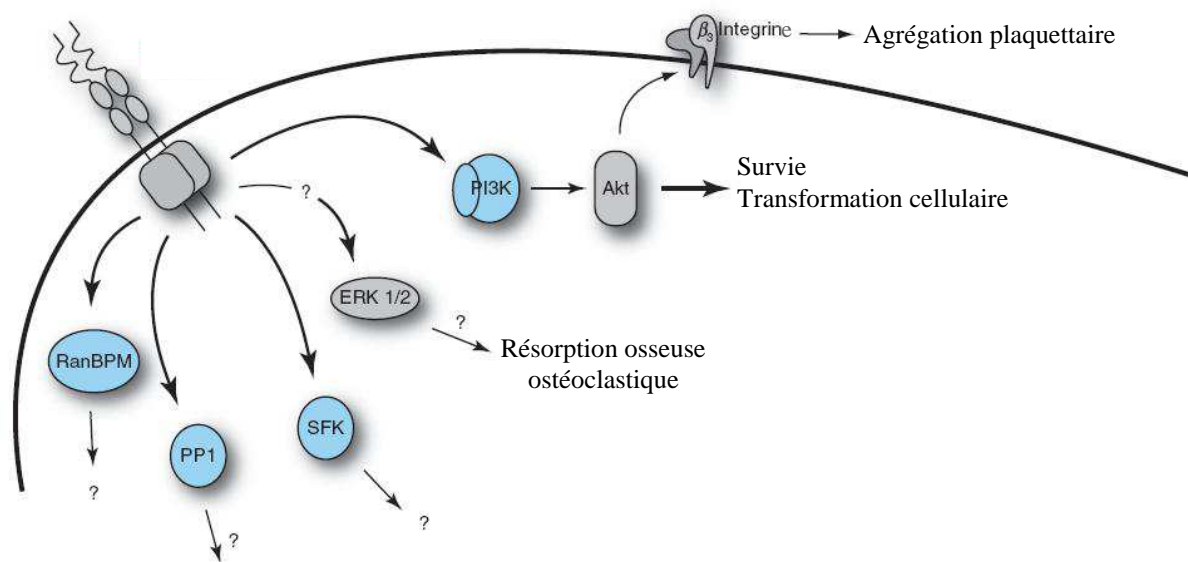


Figure 41 : Voies de signalisation induites par le récepteur Tyro3

Modifiée d'après Linger RM *et al.*, Adv Cancer Res 2008.⁴⁴⁸

D'autres types d'activation atypique des récepteurs TAM ont été suggérés. Ainsi, des études de surexpression de Tyro3⁴⁷³ et Axl⁴⁷⁴ suggèrent que ces récepteurs sont aussi capables d'induire leur homo-dimérisation et leur autophosphorylation de manière indépendante de leurs ligands (figure 40C). Une étude menée par Budagian et coll en 2005, a mis en évidence un autre type d'activation du récepteur Axl, par dimérisation hétérotopique indépendante de ligand avec un autre récepteur à activité tyrosine kinase, ne faisant pas partie des récepteurs TAM, le récepteur α de l'IL-15 (IL-15R α) (figure 40D).⁴⁷⁵ Dans le même temps, cette étude a montré que la fixation de l'IL-15 sur le récepteur IL-15R α , mais pas sur le récepteur Axl, induisait la phosphorylation de IL-15R α médiée par Axl, ainsi que l'activation des voies de signalisation induites par Axl.⁴⁷⁵ Enfin, une activation intercellulaire homophile du récepteur Axl a été mise en évidence par liaison entre les domaines extracellulaires de ce récepteur exprimés par deux cellules voisines (figure 40E). Ceci suggère que l'agrégation cellulaire permettrait d'induire l'activation et la signalisation du récepteur Axl.⁴⁶⁶

2.4 Signalisation et fonctions cellulaires

La fonction physiologique des récepteurs TAM a principalement été élucidée grâce à la génération de souris déficientes pour chacun de ces récepteurs ou pour des combinaisons de 2 voire des 3 récepteurs (tableau 6). L'absence de phénotype « grave » chez les animaux déficients simples (malgré un défaut de phagocytose constaté chez les individus Mer^{-/-})⁴¹⁰ a amené l'hypothèse selon laquelle ces récepteurs ne joueraient qu'un rôle physiologique mineur. Cependant la génération d'animaux triple déficients pour les récepteurs TAM montre que l'expression conjointe de ces trois récepteurs est importante pour le bon fonctionnement du système nerveux,⁴⁷⁶ du système immunitaire,⁴⁷⁷ du système visuel⁴⁷⁶ et de la spermatogenèse.⁴⁷⁶ L'activation de ces récepteurs et les voies de signalisation associées pourraient jouer un rôle important, notamment dans ces phénomènes.

2.4.1 Tyro3

Le récepteur Tyro3, dont l'expression est principalement rencontrée dans le système nerveux, est le moins étudié des trois récepteurs TAM. Actuellement aucune étude n'a permis l'identification des résidus tyrosine phosphorylés lors de l'activation de Tyro3. Cependant, des expériences de co-immunoprécipitation de Tyro3, exprimé de manière transitoire dans des cellules COS, révèlent des interactions avec les protéines kinases de la famille Src (SFKs) (figure 41).⁴⁷⁸ Des études de double hybride ont permis l'identification d'interaction entre

Axl

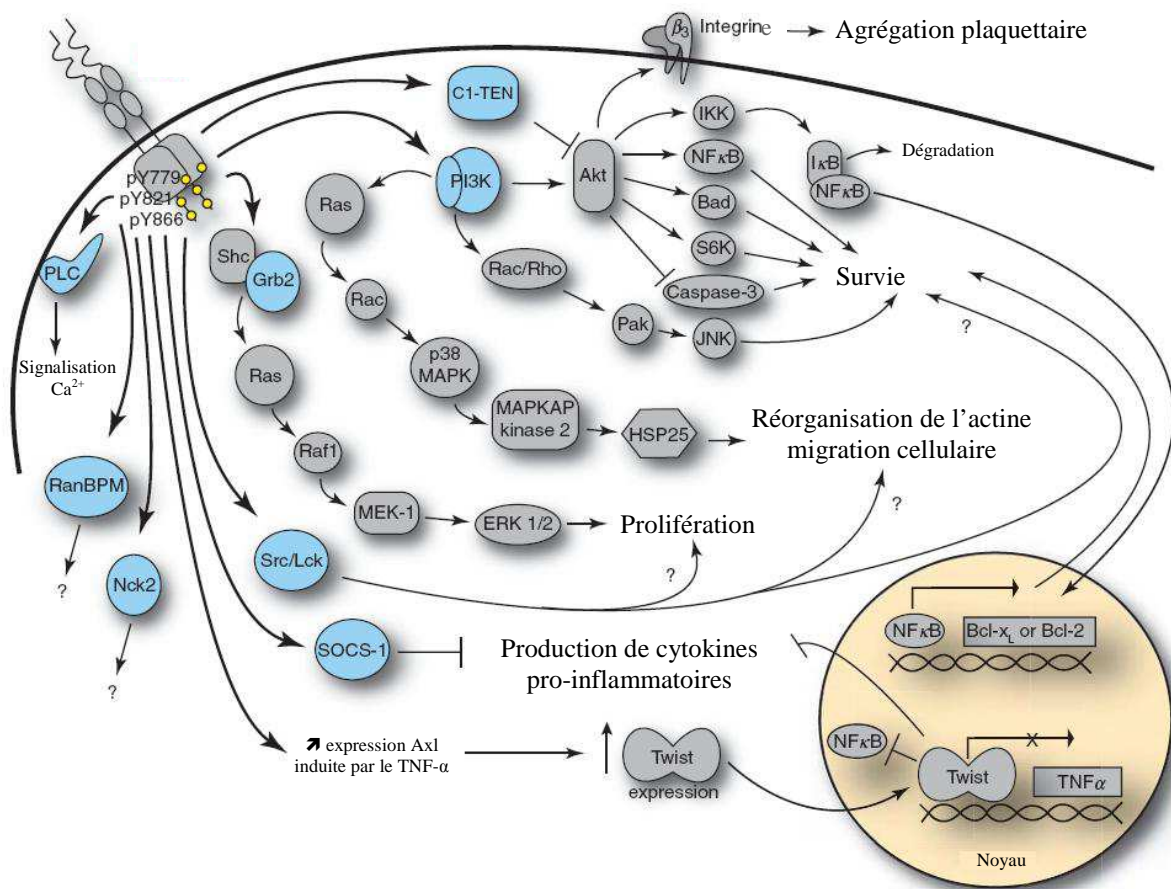


Figure 42 : Voies de signalisation induites par le récepteur Axl

Modifiée d'après Linger RM *et al.*, Adv Cancer Res 2008.⁴⁴⁸

Tyro3 et les protéines RanBPM,⁴⁷⁹ la protéine phosphatase 1 (PP1) et la sous unité β p85 de la PI3K.⁴⁸⁰ Cette activation de la PI3K médiée par Tyro3 a également été mise en évidence suite à sa stimulation par la protéine S dans les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique et dans les neurones, aboutissant à la résistance à l'apoptose.^{436,437,440} Enfin, la voie de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2 a été reliée à l'activation de Tyro3, notamment suite à l'observation de la phosphorylation de Erk 1/2 après stimulation par la protéine Gas6 dans les ostéoclastes de souris, permettant la résorption osseuse.⁴⁸¹ La fonction de Tyro3 est ainsi principalement associée à la résorption osseuse^{441,481} ainsi qu'à la protection du système nerveux central.^{436,437,440}

2.4.2 Axl

L'activation du récepteur Axl en présence de ligand ou non, induit la phosphorylation des résidus tyrosines Tyr⁷⁷⁹, Tyr⁸²¹ et Tyr⁸⁸⁶ de son domaine à activité tyrosine kinase intracellulaire. Ces trois résidus et plus particulièrement le résidu Tyr⁸²¹, sont responsables de l'interaction d'Axl avec les protéines de la signalisation telles que la PLC- γ , la PI3K, les SFKs et la protéine adaptatrice Grb2 (figure 42).^{478,482,483} La signalisation induite par le couple Gas6/Axl est impliquée dans la prolifération cellulaire via l'activation directe de Grb2 par le résidu Tyr⁸²¹ ou indirecte suite à son association avec Shc, en amont de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2.^{483,484} L'activation de la voie de la PI3K par Axl a, quant à elle, été corrélée à une amélioration de la survie cellulaire.⁴⁸⁵ Le couple Gas6/Axl est impliqué plus spécifiquement lors de la survie d'un grand nombre de types cellulaires,⁴⁴⁸ via la phosphorylation de la protéine de survie Bad,⁴⁸⁴ du facteur de transcription NF κ B connu pour augmenter l'expression de protéines anti-apoptotiques⁴⁸⁶ et lors de l'inhibition de l'activation de protéines apoptotiques telles que la caspase-3.⁴⁸⁷ Des études ont démontré l'implication d'Axl dans la migration des neurones GnRH du bulbe olfactif vers le cerveau antérieur grâce à la voie de signalisation de la PI3K et de la MAP-Kinase p38 aboutissant à la réorganisation du cytosquelette d'actine.^{488,489} Les protéines SOCS 1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1), l'ubiquitine ligase C (Cbl) et l'inhibiteur de la réaction inflammatoire C1-TEN (C1 domain-containing phosphatase and tensin homolog) ont été identifiés comme des protéines pouvant potentiellement interagir avec Axl par la technique de double hybride.^{459,490} La protéine phosphatase C1-TEN serait une protéine régulatrice de l'activité d'Axl alors que l'ubiquitine ligase C permettrait sa dégradation par la voie du protéasome après activation.⁴⁶⁰ Enfin, le récepteur Axl est à l'origine de la régulation de la signalisation induite par d'autres récepteurs

Mer

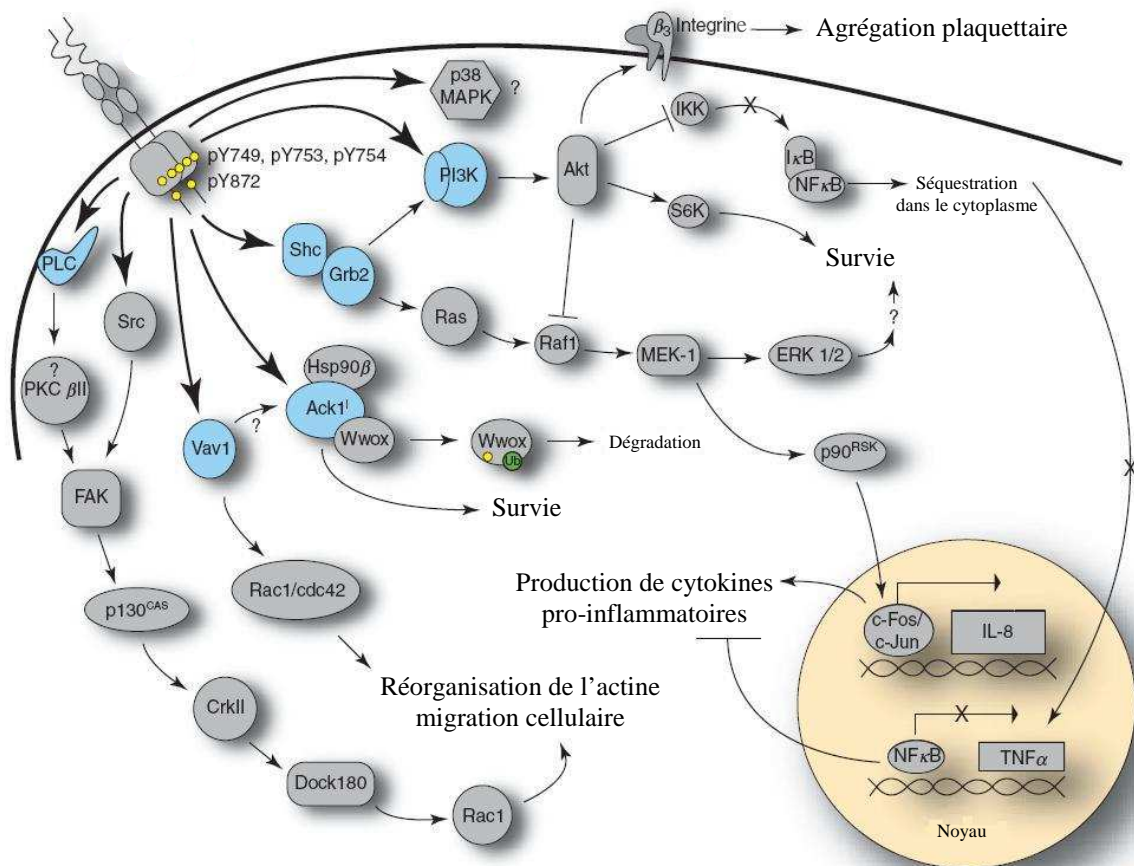


Figure 43 : Voies de signalisation induites par le récepteur Mer

Modifiée d'après Linger RM *et al.*, Adv Cancer Res 2008.⁴⁴⁸

tyrosine kinase tels que le VEGFR2, soit par interaction directe⁴⁹¹ soit par régulation de leur activation via la protéine phosphatase SHP2.³²² De par la signalisation intracellulaire qu'il induit et son rôle lors de la prolifération et la survie des cellules de mélanome,⁴⁹² lors de la prolifération de cellules cancéreuses prostatiques,⁴⁹³ lors de la migration des cellules musculaires lisses⁴⁹⁴ et lors de l'adhérence cellulaire,⁴⁸⁹ Axl est considéré comme un oncogène. Ces observations sont appuyées par de nombreuses publications démontrant son implication dans la croissance tumorale, l'angiogenèse et la dissémination de métastases.⁴⁹⁵⁻⁵⁰⁰ La surexpression d'Axl est associée à un mauvais pronostic vital pour les patients atteints de glioblastome,⁵⁰¹ ce qui a amené à le considérer comme une cible thérapeutique pour traiter la progression tumorale.⁵⁰²⁻⁵⁰⁴ Enfin, le traitement par une molécule inhibitrice de l'activité tyrosine kinase de Axl permet l'amélioration de la survie dans des modèles de cancer métastatiques mammaires.⁵⁰⁵

2.4.3 Mer

Comme pour le récepteur Axl, l'activation du récepteur Mer induit la phosphorylation de 3 résidus tyrosines : Tyr⁷⁴⁹, Tyr⁷⁵³ et Tyr⁷⁵⁴. Le résidu Tyr⁷⁴⁹ joue un rôle plus important que les autres résidus lors de l'activité tyrosine kinase du récepteur Mer.⁵⁰⁶ La plupart des informations concernant la signalisation induite par le récepteur Mer ont été apportées par la production de protéines chimériques de ce récepteur. Comme cela a été démontré pour le récepteur Axl, l'activation du récepteur Mer induit le recrutement de la PI3K, de Grb2 et de la PLC- γ médiant respectivement l'activation de Akt, de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 et de la PKC (figure 43). Cette étude a notamment montré l'implication de ces voies de signalisation lors de la prolifération des cellules fibroblastiques de souris NIH3T3.⁴⁵⁶ Plus tard, suite à la découverte de la protéine Gas6 comme ligand pour le récepteur, une équipe a démontré que l'activation du récepteur Mer par Gas6 stimule la phosphorylation de Erk 1/2.⁴⁴² L'activation du récepteur Mer par phosphorylation induit le recrutement direct de la PLC- γ ⁵⁰⁷ et de la PI3K⁵⁰⁸ par liaison de leur domaine SH2. Dans certaines cellules, les voies de signalisation des MAP-Kinases et de la PI3K activée par le récepteur Mer peuvent agir de manière concertée ou opposée. Ainsi ces voies de signalisation agissent de manière convergente dans les cellules leucémiques, où l'activation du récepteur chimérique EGFR-Mer induit la phosphorylation de Akt, Erk 1/2 et p38 responsables d'une augmentation de la survie des cellules leucémiques sans conséquences sur leur prolifération.⁵⁰⁹ En revanche, une étude menée sur des cellules cancéreuses prostatiques exprimant un récepteur Mer chimérique

a démontré que l'activation de la voie des MAP-Kinase induit l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-8⁵¹⁰, alors que d'autres études ont démontré que l'inhibition de l'activité de la PI3K augmente la production d'IL-8. Les auteurs suggèrent que la voie de signalisation de la PI3K atténue les effets de la voie de signalisation des MAP-Kinases en phosphorylant et en inhibant la protéine Raf.⁴⁴⁸ Une autre possibilité existe, l'activation du récepteur Mer stimulerait une voie de signalisation spécifique et unique dans certaines conditions. Cette voie de signalisation altérerait les effets cellulaires et la signalisation d'autres voies de signalisation en aval. Par exemple, selon certaines études, l'activation de la voie de la PI3K par le récepteur Mer a un rôle opposé lors de l'activation du NFκB dans divers types cellulaires.^{508,511} Des expériences de double hybride ont également mis en évidence des interactions directes entre le récepteur Mer et le domaine SH2 des protéines Grb2, Shc et Vav1.⁴⁵⁹ De manière surprenante, la protéine Vav1 est constitutivement associée au récepteur Mer. L'activation du récepteur Mer suite à sa stimulation par la protéine Gas6 induit à la fois la phosphorylation et la libération de Vav1 du récepteur Mer.⁵¹² Ces observations suggèrent que l'activation du récepteur peut permettre la réorganisation du cytosquelette d'actine afin de modifier la morphologie cellulaire nécessaire à la phagocytose des cellules apoptotiques liées à la membrane des macrophages. L'activation de la PKC et de la protéine kinase Src interviendraient également lors de la réorganisation du cytosquelette d'actine induit par l'activation du récepteur Mer. Cette voie de signalisation faisant intervenir les protéines kinases d'adhérence focales (FAK) permet la phagocytose de cellules apoptotiques liées aux macrophages par l'intermédiaire de la protéine Gas6.⁵⁰⁷ Les voies de signalisation activées par le récepteurs Mer ont démontré son implication lors des processus de prolifération, de survie et de réorganisation du cytosquelette. Les études d'inactivation du gène codant pour le récepteur Mer chez la souris et le phénotype des rats naturellement déficients pour ce récepteur, ont permis de démontrer son implication prépondérante lors de la phagocytose des débris apoptotiques nécessaire au bon fonctionnement des systèmes reproducteur et visuel.⁴⁰⁸ Son rôle physiologique lors de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs suite à son activation par la protéine S et la protéine Gas6 est particulièrement bien décrit.^{431,446,447} En outre, l'activation du récepteur Mer par la protéine Gas6 stimule la phagocytose de cellules apoptotiques et de débris cellulaires par les cellules de Sertoli.⁵¹³

La surexpression du récepteur Mer a été démontrée dans plusieurs cas de cancer humains, incluant les cellules de lymphome,⁵¹⁴ de leucémie,^{515,516} des rhabdomyosarcomes alvéolaires,⁵¹⁷ des cancers gastriques⁵¹⁸ et des adénomes de la glande pituitaire.⁵¹⁹ Son implication a d'ailleurs été démontrée lors de la survie et de l'invasion des glioblastomes,⁵²⁰ ainsi que de cancers pulmonaires non à petites cellules.⁵²¹ Plusieurs équipes ont démontré que le récepteur Mer constitue une cible thérapeutique intéressante lors du traitement de la leucémie lymphoblastique⁵²² et de certains mélanomes.⁵²³

Migdall-Wilson et coll. ont démontré en 2012 pour la première fois que le récepteur Mer est capable de se transloquer dans le noyau de cellules leucémiques suite à une exposition prolongée à son ligand Gas6. Cette étude suggère que le récepteur Mer pourrait influencer directement l'expression de différents gènes impliqués lors de la croissance tumorale par ce phénomène.⁵²⁴

Enfin, il a été démontré que l'activation du récepteur Mer peut être modulée par la production d'une forme soluble suite à son clivage par une MMP.⁴⁶² Le taux élevé de protéine Mer soluble retrouvé dans le plasma humain suggère qu'il pourrait jouer un rôle physiologique. Il a ainsi été démontré que le récepteur Mer soluble est capable de neutraliser la protéine Gas6, inhibant de ce fait la stimulation du récepteur Mer membranaire induite par Gas6. L'inhibition de l'activité de Gas6 par le récepteur Mer soluble conduit à l'inhibition de la phagocytose de cellules apoptotiques par les macrophages, à la diminution de l'agrégation plaquettaire⁴⁶² et à l'attraction des cellules endothéliales par les cellules cancéreuses.⁵²⁵

L'ensemble de ces études récentes montre que le récepteur Mer pourrait jouer un rôle primordial lors de la croissance tumorale.

3 La protéine S, les récepteurs TAM et le système vasculaire

A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées au rôle joué par la protéine S dans le système vasculaire. Une étude récente menée chez des souris homozygotes pour la délétion du gène *PROS1* (*PROS*^{-/-}) a montré que ces animaux présentaient des zones hémorragiques importantes liées à des défauts de vascularisation ce qui a eu pour conséquence la mort des animaux *in utero*.^{400,404} Ces observations suggèrent que la protéine S joue un rôle prépondérant lors du développement du système vasculaire embryonnaire. L'analyse des individus hétérozygotes pour la délétion du gène *PROS1* (*PROS*^{+/-}) montre que ces derniers arrivent à terme mais présentent des anomalies de développement et de fonction du système vasculaire qui ne sont pas observées chez les souris déficientes pour la protéine C.^{400,404} Ces observations confirment le rôle important joué par la protéine S lors du développement du système vasculaire indépendamment de son activité en tant que cofacteur de la protéine C. De plus, la délétion spécifique et conditionnelle du gène *PROS1* dans les cellules musculaires lisses vasculaires chez la souris induit des défauts de vascularisation similaires à ceux observés chez les individus *PROS*^{+/-}, tandis que cette même délétion dans les hépatocytes (supposés être la source principale de protéine S) n'induit pas de défaut de vascularisation.⁴⁰⁴ A la lumière de ces observations, il semble que la protéine S produite par les cellules musculaires lisses vasculaires joue un rôle essentiel pour la stabilité et la maturation du système vasculaire chez l'adulte. Des études antérieures viennent corroborer cette hypothèse puisqu'elles montrent *in vitro* que la protéine S induit la prolifération,^{427,428,526,527} et agit comme facteur de survie⁵²⁷ pour les cellules musculaires lisses vasculaires, en activant la voie des MAP-K Erk 1/2.⁵²⁷

Il a été par ailleurs montré que les cellules endothéliales *in vitro*,⁴⁰⁷ tout comme les cellules musculaires lisses,⁴⁰⁹ synthétisent de la protéine S. La délétion spécifique du gène *PROS1* dans les cellules endothéliales n'entraîne pas de phénotype particulier. Les animaux à la naissance et à l'âge adulte sont viables. Seuls quelques dépôts de fibrine sont détectés mais cela n'entraîne pas d'occlusion des vaisseaux. De façon intéressante, cette étude démontre que les cellules endothéliales sont la deuxième source de protéine après le foie, respectivement 43% et 55% de la protéine S totale circulante.⁴⁰⁴

Outre la protéine S, les cellules endothéliales expriment aussi les récepteurs TAM^{440,528}. Une étude a montré que la protéine S, en activant le récepteur Tyro3, protège la barrière hémato-encéphalique de la rupture induite par l'hypoxie et par l'absence de glucose⁴⁴⁰. Holland et coll. ont démontré que la répression de l'expression de Axl réduit

la migration des cellules endothéliales alors que sa surexpression augmente la capacité des cellules endothéliales à former des structures capillaires *in vitro*.⁵⁰⁰ Cette même étude met en évidence que la répression stable de l'expression de Axl diminue la formation et le fonctionnement des vaisseaux sanguins dans un modèle murin *in vivo*.⁵⁰⁰ Alors que l'implication du récepteur Axl a été plus particulièrement démontrée au cours de l'angiogenèse, l'implication des récepteurs Tyro3 et Mer n'a pas été étudiée à l'heure actuelle.

L'implication de l'homologue structural de la protéine S, la protéine Gas6, au cours du développement du système vasculaire via l'activation des récepteurs TAM a été démontrée dans divers modèles. Le couple Gas6/Axl a été plus particulièrement étudié au cours de l'angiogenèse. Tout débute en 1995, lorsque Nakano et coll. mettent en évidence pour la première fois l'expression de la protéine Gas6 par les cellules musculaires lisses vasculaires. Les auteurs suggèrent que Gas6 induit la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires grâce à l'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase.⁵²⁹ Deux ans plus tard, une étude démontre que Gas6 induit la migration des cellules musculaires lisses vasculaires suite à l'activation du récepteur Axl.⁴⁹⁴ En 2004, Hasanbasic et coll. démontrent que le couple Gas6/Axl permet la survie des cellules endothéliales.⁴⁸⁷ Puis, en 2005, Gallichio et coll. mettent en évidence le rôle anti-angiogénique du couple Gas6/Axl. Les auteurs démontrent que l'activation de Axl par la protéine Gas6 permet l'activation de la protéine phosphatase SHP2 responsable de la déphosphorylation du VEGFR2 induite par le VEGFA. Ce mécanisme de régulation inhibe la formation du réseau capillaire induit par le VEGFA ainsi que la vascularisation dans le modèle *in vivo* de la membrane chorioallantoïdienne de poulet (CAM).³²² Une autre équipe démontre que le récepteur Axl est non seulement important lors de la croissance tumorale mais aussi pour la migration des cellules endothéliales, lors de la formation du réseau capillaire *in vitro*, ainsi que dans l'angiogenèse *in vivo*.⁵⁰⁰ Ces observations sont confirmées en 2009 par une autre équipe qui démontre que cet effet pro-angiogénique induit par Axl est complémentaire à celui induit par le VEGFA.⁴⁹⁸ En 2012, une étude réalisée par Ruan et coll. a mis en évidence la nécessité de l'interaction entre le récepteur Axl et le VEGFR2 lors de l'activation de la voie de signalisation de la PI3K dépendante du VEGFA.⁴⁹¹ L'ensemble de ces observations indique que le couple Gas6/Axl serait impliqué dans l'induction de l'angiogenèse alors qu'une seule étude suggère qu'il joue un rôle anti-angiogénique.

Une étude récente publiée en 2011 dans Nature s'intéressant plus particulièrement au rôle joué par le miRNA-126 lors du recrutement des cellules endothéliales et de la formation des métastases cancéreuses par les cellules tumorales, a mis en évidence le rôle majeur joué par le système Mer soluble/Gas6/récepteur Mer lors de la migration des cellules endothéliales induite par les cellules cancéreuses. Les auteurs montrent que la protéine Gas6 réprime la migration des cellules endothéliales en activant le récepteur Mer. Cette répression peut être levée par la production de récepteur Mer soluble dont la fonction est de neutraliser la protéine Gas6.⁵²⁵

Objectifs de l'étude

De nombreuses études ont montré que les cellules constituant les vaisseaux sanguins telles que les cellules musculaires lisses⁴⁰⁹ et les cellules endothéliales^{404,407} sécrètent la protéine S, et expriment ses récepteurs TAM.^{440,528} Partant de ces données, nous avons émis l'hypothèse que, outre la protéine S circulante, la protéine S endogène du vaisseau sanguin ainsi que ses récepteurs TAM constituent un système autocrine/paracrine qui régulerait l'activité des divers types cellulaires composant les vaisseaux sanguins, le développement et le fonctionnement du système vasculaire.

Dans le cadre de mon travail de thèse, j'ai focalisé mon attention sur les interactions entre la protéine S et l'endothélium en rapport avec l'angiogenèse. Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence le rôle joué par la protéine S au cours de l'angiogenèse *in vivo* grâce à la réalisation du test du bouchon de Matrigel et *in vitro* dans le modèle de formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales sur Matrigel.

Suite aux résultats obtenus, qui ont établi clairement un effet inhibiteur de la protéine S sur l'angiogenèse *in vivo* et sur la capacité des cellules endothéliales à former des structures vasculaires *in vitro*, j'ai recherché le rôle joué par la protéine S lors des événements cellulaires nécessaires à la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que les voies de signalisation qui leur sont associées. J'ai ensuite recherché le mécanisme mis en jeu par la protéine S lors de son action anti-angiogénique. Enfin, j'ai cherché à identifier le(s) récepteur(s) TAM impliqués grâce à la répression de leur expression par la technique des petits ARN interférents.

Dans un second temps, j'ai observé un effet direct joué par la protéine S sur la prolifération des cellules endothéliales. J'ai alors recherché les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans cet effet grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques. Enfin, nous avons cherché à identifier le(s) récepteur(s) TAM impliqués.

Ces travaux permettront d'élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets de la protéine S sur les cellules endothéliales. Ils établissent pour la première fois que la protéine S est à la fois un inhibiteur endogène de l'angiogenèse et un activateur des cellules endothéliales.

Approches expérimentales et techniques mises en œuvre

| | | |
|----|---|-----|
| 1 | Modèles cellulaires..... | 139 |
| 2 | Modèle animal..... | 141 |
| 3 | Test de vascularisation du « bouchon de Matrigel » <i>in vivo</i> | 143 |
| 4 | Interférence par petits ARN | 145 |
| 5 | Test de morphogenèse : formation de structures capillaires par les cellules endothéliales <i>in vitro</i> | 149 |
| 6 | Test de prolifération cellulaire par incorporation de la Bromodéoxyuridine..... | 151 |
| 7 | Test de migration cellulaire par la technique de la chambre de Boyden..... | 157 |
| 8 | Mesure du taux d'expression des ARNm par RT-PCR quantitative (RT-qPCR) ... | 159 |
| 9 | Mesure du taux d'expression et d'activation des protéines par Western blotting... | 167 |
| 10 | Analyses statistiques | 171 |

Approches expérimentales et techniques mises en œuvre

1 Modèles cellulaires

Les cellules utilisées dans cette étude ont été cultivées stérilement sous hotte à flux laminaire, avant de les laisser croître dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂ en atmosphère humide.

1.1 Cellules endothéliales humaines

Les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVECs) choisies pour notre étude constituent le modèle cellulaire le plus commun pour l'étude de l'angiogenèse *in vitro*. Les HUVECs obtenues à partir de plusieurs cordons ombilicaux (CC-2519, Clonetics, Lonza, Walkersville, Maryland) ont été cultivées dans le milieu de culture complet appelé EGM-2 (Endothelial cell Growth Medium-2, CC-4176, Clonetics, Lonza, Walkersville, Maryland) selon les indications données par le distributeur et habituellement utilisé dans d'autres études.⁵³⁰ Le milieu EGM-2 est constitué d'un milieu de culture basique appelé EBM-2 (Endothelial cell Basal Medium-2, CC-3156, Clonetics, Lonza, Walkersville, Maryland) additionné de facteurs de croissance (VEGF, FGF2, EGF et IGF), d'hydrocortisone, d'héparine, d'acide ascorbique, d'antibiotiques (gentamicine, d'amphotéricine-B) et de Sérum de Veau Fœtal (SVF) à 2% (Bulletkit CC-3162, Clonetics, Lonza, Walkersville, Maryland). Les HUVECs en culture sont repiquées une fois que la culture cellulaire a atteint 80% de confluence. Les cellules sont lavées à l'aide d'une solution EBSS (Earle's Balanced Salt Solution, KCl 400 mg/l, NaHCO₃ 2200 mg/l, NaCl 6,8 mg/l, NaH₂PO₄-H₂O 140 mg/l, D-Glucose 1 g/l), puis détachées du support par l'action de trypsine 0,05% -EDTA 0,53 mM (Lonza, Walkersville, Maryland) pendant 5 min. L'action de la trypsine-EDTA est stoppée par l'ajout de SVF (Lonza, Walkersville, Maryland). Les HUVECs sont ensuite centrifugées 5 min à 220 g avant d'être resuspendues dans 500 µl de milieu EGM-2. Les cellules vivantes sont ensuite comptées à l'aide d'un hématimètre de Malassez avant d'êtreensemencées à la densité de 1x10⁴ cellules/cm² ou 5x10³ cellules/cm² pour obtenir une culture confluyente respectivement après 3 ou 4 jours de culture, avec changement de milieu de culture tous les 2 jours. Etant donné qu'il s'agit d'une culture de cellules primaires, les HUVECs n'ont jamais été utilisées après avoir subi plus de 5 repiquages, afin d'éviter leur dédifférenciation.

Lorsque cela est indiqué, le milieu de cultures de HUVECs a été remplacé par le milieu EBM-2 additionné de SVF à 0,5% ou d'ITS (Insuline 10 µg/ml, transferrine 6,7 ng/ml, sélénium 5,5 µg/ml, 41400045, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, Californie).

Le stockage des cellules se fait par congélation à raison de 5×10^5 cellules/ml dans une solution composée de milieu EGM-2 50%/SVF 40%/DMSO 10% dans des cryotubes placés 24 h à -80°C dans une boîte de congélation contenant de l'isopropanol assurant une descente en température progressive. Les cryotubes sont finalement transférés dans l'azote liquide à -196°C.

La décongélation des HUVECs se fait rapidement au bain marie à 37°C. Une fois les cellules décongelées, elles sont immédiatement transférées dans une flasque de culture contenant du milieu EGM-2 à 37°C à la densité de 5×10^3 cellules/cm². Une fois les cellules adhérentes, le milieu de culture est retiré et remplacé par du milieu EGM-2 à 37°C pour éviter toute toxicité due au DMSO contenu dans la solution de congélation.

1.2 Cellules de Sertoli murines

Nous avons utilisé la lignée de cellules de Sertoli murines: TM4 connue pour exprimer les récepteurs TAM,⁵³¹ afin de rechercher l'activation du récepteur Mer murin par la protéine S humaine. Les cellules TM4 ont été cultivées dans le milieu de culture DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12 medium, 31330, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, Californie) additionnée de sérum de cheval à 5%, de SVF à 2,5% et d'antibiotiques (100 U/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine, Lonza, Walkersville, Maryland). Les conditions de culture des cellules TM4 sont similaires à celles réalisées pour les HUVECs.

2 Modèle animal

Pour notre étude nous avons utilisé des souris mâles C57BL/6 âgées de 8 semaines, élevées en animalerie en respectant un cycle nyctéméral de 24 h avec accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec les recommandations du ministère français de l'agriculture et de la forêt (décret 87849), les directives du conseil européen (2010/63/UE) et le comité d'éthique local.

3 Test de vascularisation du « bouchon de Matrigel » *in vivo*

L'objectif de ce test est d'observer la néo-vascularisation d'un implant de Matrigel, injecté *in vivo* par voie sous-cutanée, suite au recrutement des vaisseaux sanguins avoisinants.

3.1 Injection sous-cutanée des bouchons de Matrigel

Ce test à été réalisé conformément à une étude précédente.⁵³² Le Matrigel (BD Biosciences Discovery Labware Bedford, Massachusetts) froid est préalablement additionné :

- Soit de protéine S humaine (Calbiochem Nottingham, United Kingdom ou Enzyme Research Laboratories South Bend, Indiana) à 25 µg/ml.
- Soit d'un mélange de facteurs pro-angiogéniques : FGF2 recombinant murin (R&D systems, Minneapolis, Minnesota) à 400 ng/ml, VEGFA recombinant murin (Invitrogen, Carlsbad, Californie) à 400 ng/ml et d'héparine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) à 50 U/ml.
- Soit d'une combinaison de protéine S et de facteurs pro-angiogéniques (ou leur tampon de dilution).

Le Matrigel est une matrice extracellulaire reconstituée composée principalement de laminine, de collagène de type IV, de protéoglycanes à héparanes sulfates et de facteurs de croissance. Un volume de 0,4 ml de Matrigel ainsi préparé est injecté par voie sous-cutanée dans le flanc de souris mâles C57/BL6 âgées de 8 semaines (n=8). Une fois injecté, le Matrigel se solidifie à la température de 37°C pour former un implant appelé « bouchon ». Sept jours après l'injection de Matrigel, les souris sont euthanasiées, le bouchon de Matrigel est retiré, photographié, puis fixé dans une solution de formol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) à 10%.

3.2 Analyse histologique

Les bouchons de Matrigel ont été inclus dans un bloc de paraffine puis coupés en sections de 4 µm au microtome. Les coupes obtenues ont été colorées à l'aide d'une solution d'hématoxyline (coloration nucléaire violette) ou d'éosine (coloration des protéines cytoplasmiques rose). Afin d'observer spécifiquement la présence de vaisseaux sanguins, un marquage immunohistochimique des cellules endothéliales a été réalisé sur ces coupes à l'aide d'anticorps dirigés contre le marqueur endothélial CD31 murin (BD Pharmingen, Dan Diego, Californie). Le CD31 (ou PECAM-1) est une glycoprotéine transmembranaire fortement exprimée par les cellules endothéliales composant les vaisseaux sanguins et

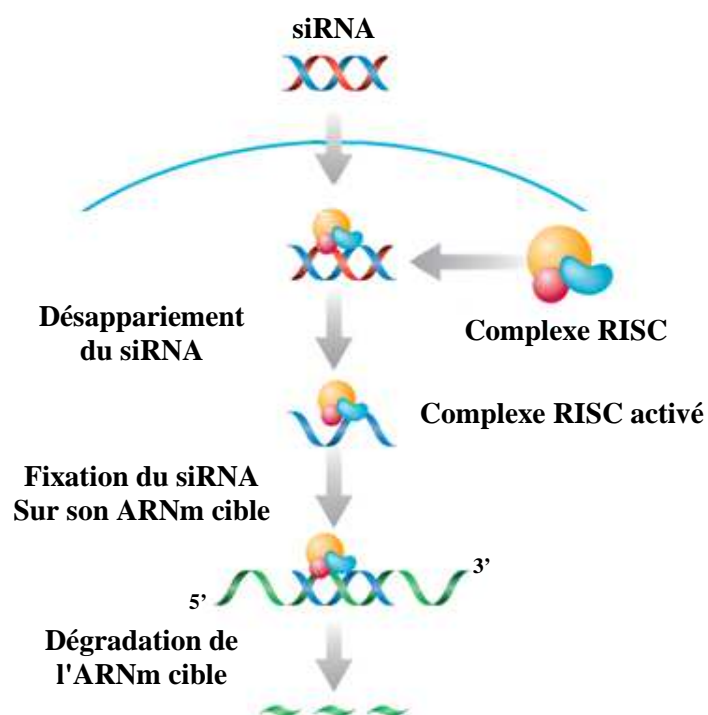


Figure 44 : Mécanismes de l'interférence par petit ARN (siRNA)

Modifiée d'après Santa Cruz

| siRNA target gene (RefSeq) | Species specificity | siRNA sense | Primer Sequence (5' > 3') |
|---|------------------------|----------------|---------------------------|
| Tyro 3 NM_006293 | Human | Forward | GAGCUUUACUUGUCUGCGAtt |
| | | Reverse | UCGCAGACAAGUAAAGCUCGg |
| Axl NM_021913 | Human | Forward | CAGCGAGAUUUUAUGACUAUtt |
| | | Reverse | AUAGUCAUAAAUCUCGCUGtt |
| Mer NM_006343 | Human | Forward | CAGUAGCCGUGUUAACGAAtt |
| | | Reverse | UUCGUUAACACGGCUACUGtt |
| SHP-1 (PTPN6) Exon 3 NM_080549.3 | Human | Forward | GGUGACCCAUAUUCGGAUCtt |
| | | Reverse | GAUCCGAAUAUGGGUCACctg |
| SHP-1 (PTPN6) Exon 10 NM_080549.3 | Human | Forward | GCAUGACACAACCGAAUACtt |
| | | Reverse | GUAUUCGGUUGUGUCAUGCtc |
| SHP-2 (PTPN11) NM_002834.3 | Human | Forward | CAAUGACGGCAAGUCUAAAtt |
| | | Reverse | UUUAGACUUGCCGUCAUUGct |

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des siRNA utilisés

habituellement utilisée en tant que marqueur spécifique de ces derniers. La coloration histologique et le marquage immunohistologique de chaque coupe a été photographié à l'aide du microscope MVX10 (Objectif : 1 x/1 ; milieu : air ; Olympus, Tokyo). L'aire occupée par les structures vasculaires, identifiées par la présence d'hématies dans leur lumière et l'aire occupée par le marquage CD31 ont été quantifiées grâce au logiciel Fiji-win32 (ImageJ 1.44c, Wayne Rasband, NIH, Bethesda, Maryland) et exprimé en pourcentage de l'aire vasculaire ou CD31 positive par champs comme cela a été précédemment décrit.^{533,534}

4 Interférence par petits ARN

Pour inhiber l'expression de certaines protéines d'intérêt nous avons utilisé la méthode d'interférence par petits ARN (siRNA : small interfering RiboNucleic Acid). Cette technique, basée sur un mécanisme naturel, a été caractérisée pour la première fois chez les plantes dans les années 1990. Elle consiste à inhiber l'expression d'un ARNm cible par fixation d'un siARN d'une vingtaine de nucléotides sur l'ARNm cible aboutissant au clivage ou à la dégradation de ce dernier et à l'absence de la traduction de la protéine associée. Les siRNA double brins doivent tout d'abord pénétrer dans la cellule par transfection, puis une fois dans la cellule ils sont pris en charge par le complexe multienzymatique RISC (RNA-Induced Silencing Complex) (figure 44). L'un des brins du siRNA (appelé "passager") est éliminé tandis que l'autre brin (appelé "guide") dirige le complexe RISC vers l'ARNm cible possédant une séquence complémentaire du siRNA guide. Lors de la synthèse de ces siRNA la séquence cible des ARNm est généralement choisie dans la région codante. L'appariement parfait entre le siRNA guide et son ARNm cible conduit à sa dégradation.

Afin de faire pénétrer les siRNA dans les HUVECs nous avons utilisé un agent transfectant chimique appelé siPORT Amine transfection agent (Ambion, Austin, Texas). Cet agent transfectant forme des gouttelettes lipidiques autour des siRNA capables de fusionner avec la membrane plasmique et de libérer le siRNA dans la cellule. Les HUVECs étant connues pour être un type cellulaire difficile à transfecter, notre choix s'est basé sur cet agent transfectant car il permet de transfecter les cellules en présence de facteurs de croissance et d'antibiotiques. De plus, il ne présente qu'une faible toxicité pour les HUVECs. Les siRNA double brins utilisés dans cette étude (tableau 7) sont commercialisés et ont été achetés à la société Ambion (Austin, Texas), tout comme le siRNA contrôle (AM4611, Ambion, Austin, Texas). Les HUVECs ont étéensemencées à raison de 2×10^5 cellules/puits/2,3 ml de milieu EGM-2 dans une plaque 6 puits ou 6×10^3 cellules/puits/80 µl de milieu EGM-2 dans une plaque 96 puits. La solution de transfection contenant 5 µl ou 0,5 µl de siPORT Amine,

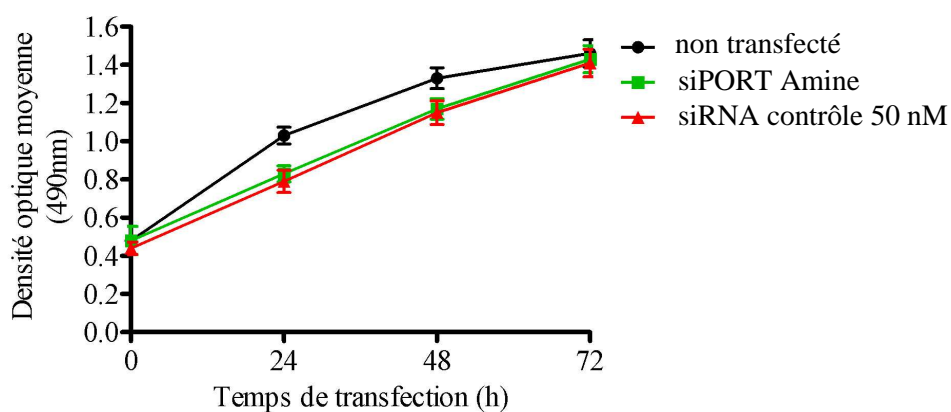


Figure 45 : Toxicité de la transfection des HUVECs

La viabilité des HUVECs a été évaluée par mesure de la densité optique à 490 nm après différents temps de transfection avec 0,5 μ l/puits d'eau ou d'agent transfectant siPORT Amine additionné ou non de siRNA contrôle à 50 nM (n=3).

respectivement pour une plaque 6 puits ou pour une plaque 96 puits additionné ou non de siRNA dilués dans le milieu Opti-MEM I (31985, Gibco, Invitrogen, Carlsbad Californie) est incubé à température ambiante, 24 h après l'ensemencement des HUVECs selon les instructions du fournisseur. Les cellules sont ensuite transfectées avec 200 µl/ puits ou 20 µl/puits respectivement pour une plaque 6 puits ou pour un plaque 96 puits avec une solution de transfection.

Dans un premier temps, nous avons évalué la toxicité engendrée par l'agent transfectant. Pour cela, les HUVECs ont été ensemencées à 6×10^3 cellules/puits dans une plaque 96 puits puis transfectées avec la solution de transfection contenant ou non 50 nM de siRNA contrôle. La viabilité cellulaire a été évaluée par le test MTS : 3-[4,5-diméthylthiazol – 2 - yl] – 5 - [3 - carboxymethoxyphenyl] – 2 - [4 - sulfophenyl] - 2 h - tétrazolium, (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, Wisconsin). Ce test colorimétrique s'appuie sur la mesure de la capacité des mitochondries des cellules vivantes à oxyder le sel de tétrazolium MTS en formazan directement excrété dans le milieu de culture, dont la densité optique peut être lue à 490 nm. La figure 45 montre que la transfection après 24 h a un effet cytotoxique de 20 % sur les HUVECs. Cet effet se dissipe au-delà de 24 h, les HUVECs proliférant d'avantage. Enfin, la transfection avec le siRNA contrôle n'a pas d'effet cytotoxique supplémentaire par rapport à la transfection avec le siPORT Amine. En raison de la cytotoxicité observée après 24 h de transfection avec le siPORT Amine, nous avons décidé de considérer cette condition comme condition contrôle.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'efficacité des siRNA par Western blot ou par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR). 24 h après la transfection, les HUVECs ont été lysées. Dans certains puits, le milieu de culture a été retiré et remplacé par 2 ml de milieu EBM-2 afin d'observer l'expression des protéines d'intérêt 48 h après la transfection. Un protocole particulier a été appliqué pour l'inhibition du gène codant pour la protéine phosphatase SHP1, en raison de sa cytotoxicité et de son mode d'action. 24 h après la transfection avec 50 nM de siRNA dirigés contre les ARNm des protéines phosphatases SHP1 et SHP2, le milieu de culture a été retiré et les cellules transfectées ont été incubées pendant 24 h avec 2 ml de milieu EGM-2, afin d'éviter l'effet cytotoxique observé en présence du siRNA SHP1. L'expression de la protéine SHP1 a été évaluée 24 h et 48 h après ce changement de milieu par Western blot selon le protocole indiqué ci-dessus.

5 Test de morphogénèse : formation de structures capillaires par les cellules endothéliales *in vitro*

Ce test permet de déterminer les effets d'une molécule ou d'une substance donnée sur la capacité des cellules endothéliales à former des structures capillaires. Sa réalisation a été précédemment décrite par d'autres équipes.³²² Ce test est considéré comme le plus proche du test de vascularisation des « bouchons de Matigel » *in vivo* car la formation des structures capillaires *in vitro* nécessite la prolifération, la migration et la dégradation de la membrane basale par les cellules endothéliales.

5.1 Conditions basales

Les puits d'une plaque 24 puits ont été recouverts de 250 µl de Matrigel, additionnée de protéine S humaine (Enzyme Research Laboratories South Bend, Indiana) à différentes concentrations, ou d'endostatine (Biopur, Bubendorf, Suisse) à 10 µg/ml ou d'albumine sérique humaine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) à 10 µg/ml. La plaque de 24 puits est ensuite conservée 4 h à température ambiante afin de permettre la formation du gel. Des HUVECs sont ensuiteensemencées dans chaque puits à raison de 10^5 cellules/puits dans 500 µl de milieu EBM-2 contenant 0,5% de SVF afin de limiter les apports exogènes en protéine S. La dépendance de la formation du réseau capillaire au VEGFA a été vérifiée par ajout d'anticorps anti-VEGFR2 humains (R&D systems, Minneapolis, Minnesota) à la concentration de 10 µg/ml. Après 24 h d'incubation, les structures capillaires sont lavées à l'aide de la solution EBSS puis incubées de nouveau pendant 30 min dans une solution d'EBSS contenant de la calcéine (calcein AM, FP-895514, Interchim, Montluçon, France) diluée à 25 µM. Après une nouvelle étape de lavage, les structures capillaires sont fixées dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 1 h à 4°C puis photographiées à l'aide du microscope MVX10 (Objectif : 1 x/1 ; milieu : air ; Filtre GFP-exposition : 100 ms ; Olympus, Tokyo). Le nombre de jonctions et/ou la longueur totale du réseau formé par les cellules endothéliales est quantifiée à l'aide du logiciel AngioQuant.⁵³⁵

5.2 Transfection de siRNA

Pour ce test, les HUVECs sont ensemencées dans une plaque 6 puits à la densité de 2×10^5 cellules/puits/2,3 ml de milieu EGM-2. Les cellules endothéliales ne forment pas spontanément un réseau de capillaires après transfection avec 50 nM de siRNA contrôle, nous

avons dû adapter la concentration en siRNA au test cellulaire et ajouter du VEGFA. Ainsi, pour une concentration en siRNA de 5 nM, et un traitement des cellules endothéliales avec 20 ng/ml de VEGFA (Invitrogen, Carlsbad, Californie), nous avons pu observer de nouveau la formation du réseau capillaire. Les expériences de validation des siRNA Mer et SHP2 ayant été menées précédemment avec la concentration de 50 nM, nous avons validé l'inhibition de l'expression de chacune de ces protéines à la concentration de 5 nM. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été transfectées comme cela a été indiqué au préalable, avec 5 nM de siRNA contrôle ou de siRNA dirigés contre l'ARN messager du récepteur Mer ou de la protéine phosphatase SHP2. 24 h après cette étape de transfection, les HUVECs transfectées ont été récoltées et resuspendues dans de l'EBM-2 contenant 0,5% de SVF et du VEGFA à 20 ng/ml. Enfin, 10^5 cellules endothéliales transfectées ont étéensemencées sur le Matrigel additionné ou non de protéine S humaine à 20 µg/ml.

6 Test de prolifération cellulaire par incorporation de la Bromodéoxyuridine

La prolifération cellulaire a été mesurée à l'aide du kit Cell proliferation ELISA, BrdU chemiluminescent kit (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne) dont la détection est réalisée par chemiluminescence. Ce test est basé sur le taux d'incorporation de la Bromodéoxyuridine (5-bromo-2'-déoxyuridine, BrdU), un nucléotide synthétique analogue de la thymidine. Cette propriété lui permet de s'incorporer à l'ADN nouvellement synthétisé par les cellules en phase de prolifération en se substituant à la thymidine lors de la réplication de l'ADN durant la phase S du cycle cellulaire. La détection de la BrdU est réalisée par immunoassay, selon le principe ELISA. Ainsi, ce test permet la détection des cellules en prolifération c'est-à-dire, en phase S du cycle cellulaire.

6.1 Conditions basales

Les HUVECs sont ensemencées dans une plaque opaque de 96 puits (137101, Nunc, Roskilde, Danemark) à 6×10^3 cellules/puits/100 µl de milieu EGM-2. 24 h après l'ensemencement, le milieu est retiré et remplacé par 100 µl de milieu EBM-2 contenant du VEGFA recombinant humain, associé ou non à du FGF2 recombinant humain, additionné ou non de protéine S humaine ainsi que 10 µM de BrdU. Le VEGFA recombinant humain et le FGF2 utilisés sont distribués par la société Invitrogen (Carlsbad, Californie). Les cellules sont ensuite incubées 24 h afin de permettre l'incorporation de la BrdU dans l'ADN des cellules en prolifération.

| Inhibiteurs | Mode d'action | Concentrations (μ M) | Durée de prétraitement (h) | Fournisseurs |
|-------------|--|------------------------------|-------------------------------|---|
| UO126 | Inhibiteur de l'activité de MEK1 et de MEK2 | 1 | 1 | Calbiochem Nottingham, United Kingdom |
| PD 098059 | Inhibiteur de l'activité de MEK1 | 20 | 1 | |
| PTP IV | Inhibiteur de l'activation de SHP2 | 10 | 1 | |
| PP2 | inhibiteur de l'activité des protéines kinases de la famille Src | 10 | 1 | |
| NSC 87877 | Inhibiteur de l'activation de SHP1 et de SHP2 | 100 | 3 | Tocris Bioscience Ellisville, Missouri |

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation utilisés

Les HUVECs sont ensuite fixées et l'ADN dénaturé par l'ajout pendant 30 min à température ambiante de 200 µl/puits de solution FixDenat fournie par le kit. La dénaturation de l'ADN permet d'améliorer l'accessibilité des anticorps à la BrdU. Les cellules sont ensuite incubées en présence des anticorps anti-BrdU (100 µl/puits) couplé à la peroxydase (POD) pendant 90 min à température ambiante. Suite à 3 lavages de 2 min, le substrat de la peroxydase (luminol) est ajouté dans chaque puits (100 µl/puits) et incubé 3 min sous agitation à l'obscurité. La peroxydase va alors catalyser l'oxydation du luminol, conduisant à la formation d'un produit luminescent. La lecture de la luminescence est réalisée à l'aide du lecteur de plaque Mithras LB940TM (Berthold, Oak Ridge, Tennessee) sans filtre. Pour cette expérience, la spécificité de fixation de la BrdU et des anticorps anti-BrdU-POD a été testée en déterminant le taux de liaisons non spécifiques de ces derniers sur la plaque 96 puits ainsi que sur les cellules.

Afin de démontrer que les effets observés sont bien spécifiques à la protéine S, nous avons inhibé son activité. Pour cela, avant d'être ajoutée aux cellules, la protéine S (10 µg/ml) a été préalablement neutralisée pendant 1 h à 4°C sous rotation à l'aide d'anticorps de lapin anti-protéine S (Dako, Glostrup, Danemark) à la concentration de 40 µg/ml ou en présence des anticorps contrôles produits chez la même espèce (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Californie) à la même concentration.

6.2 Inhibition de l'activation des voies de signalisation par traitement pharmacologique

L'implication de certaines protéines de la signalisation intracellulaire a été étudiée grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques. Les inhibiteurs utilisés, leur mode d'action et la concentration à laquelle ils ont été utilisés pour ce test sont répertoriés dans le tableau 8. Les HUVECs ont été préalablement pré-traitées avec les inhibiteurs pharmacologiques aux concentrations et aux temps indiqués dans le tableau 8. A la fin du prétraitement le milieu a été retiré et remplacé par 100 µl de milieu EBM-2 contenant le traitement souhaité ainsi que la BrdU à la concentration finale de 10 µM.

6.3 Inhibition de l'activation des récepteurs TAM par utilisation d'anticorps bloquants

Le but de cette expérience est d'inhiber l'activation des récepteurs TAM par la protéine S. Pour cela des anticorps dirigés contre la partie N-terminale extracellulaire des récepteurs sont utilisés. Leur fixation sur les récepteurs TAM crée un encombrement stérique empêchant la fixation de leurs ligands sur les récepteurs et donc leur activation par ces derniers. Les HUVECs ont été pré-traitées pendant 1 h dans 80 µl de milieu EBM-2 additionné avec des anticorps de chèvre anti-Tyro3 (épitope cible : acides aminés 1 à 428, site de liaison autour de l'acide aminé 210, R&D systems, Minneapolis, Minnesota), ou anti-Axl (épitope cible : acides aminés 33 à 440, site de liaison autour de l'acide aminé 210, R&D systems, Minneapolis, Minnesota), ou anti-Mer (épitope cible : acides aminés 26 à 499, site de liaison autour de l'acide aminé 100, R&D systems, Minneapolis, Minnesota) à la concentration de 10 µg/ml ou des anticorps contrôles produits chez la même espèce (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Californie) à la même concentration comme cela a été décrit dans une autre publication.⁴⁴⁰ Une fois le prétraitement réalisé, 20 µl de solution contenant les traitements souhaités concentrés cinq fois sont rajoutés dans les puits ainsi que la BrdU à la concentration finale de 10 µM.

6.4 Transfection par siRNA

Afin d'identifier le ou les récepteurs TAM et la ou les protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire induite par la protéine S, nous avons inhibé leur traduction grâce à la méthode d'interférence par petits ARN. Ainsi, Les HUVECs ont étéensemencées à la densité de 6×10^3 cellules/puits/100 µl de milieu EGM-2 et incubées 24 h à 37°C. Les HUVECs ont ensuite été transfectées pendant 24 h avec l'agent transfectant siPORT Amine additionné ou non de 5 ou 50 nM de siRNA contrôle ou dirigé contre les ARNm des protéines d'intérêt. 24 h après la transfection, le milieu a été retiré et remplacé par les solutions contenant les traitements appropriés ainsi que la BrdU à la concentration finale de 10 µM.

7 Test de migration cellulaire par la technique de la chambre de Boyden

La technique de la chambre de Boyden est couramment utilisée pour étudier les propriétés chimiotactiques de molécules. Ce dispositif met en jeu deux compartiments séparés par un filtre poreux ayant des pores de 5 μm sur lequel sontensemencées les cellules. La capacité chimiotactique d'une molécule est évaluée grâce à la migration des cellules du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur contenant la molécule à travers le filtre poreux. Les cellules ayant migré se retrouveront ainsi sur la face inférieure du filtre. $2,5 \times 10^4$ HUVECs resuspendues dans 200 μl de milieu EBM-2/0,25% d'Albumine Sérique Bovine (Bovine Serum Albumin, BSA) sont ensemencées sur le filtre de l'insert (Costar, Corning Incorporated, New York). Le compartiment inférieur du puits est rempli avec 400 μl de milieu EBM-2 contenant 0,25% de BSA seul ou supplémenté de VEGFA humain à 20 ng/ml en présence ou non de protéine S à 10 $\mu\text{g/ml}$. Après 4 h d'incubation, les cellules présentes sur la face supérieure du filtre sont enlevées à l'aide d'un coton-tige. Les HUVECs ayant migrées, présentes sur la face inférieure du filtre, sont fixées dans du méthanol pendant 15 min à température ambiante. Après un rinçage rapide avec une solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate-buffered saline, PBS : NaCl 140 mM, NaH_2PO_4 5 mM, KH_2PO_4 1 mM, pH=7,4), les noyaux des cellules sont colorés avec de l'hématoxyline, puis après un nouveau rinçage, le cytoplasme des cellules est coloré à l'éosine. Enfin, les filtres sont découpés au scalpel et placés entre lame et lamelle dans un milieu de montage (Mowiol). Les filtres sont photographiés au microscope Zeiss (objectif 20x ; Zeiss, Oberkochen, Allemagne) et les cellules ayant migré sont comptées sur 15 champs aléatoirement choisis à l'aide du logiciel ImageJ 1.39o (National Institutes of Health, Etat Unis).

8 Mesure du taux d'expression des ARNm par RT-PCR quantitative (RT-qPCR)

Cette technique consiste à rétro-transcrire l'ensemble des ARN issus d'une culture cellulaire en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse. La quantité relative des ADNc d'intérêt est ensuite estimée par rapport à la quantité d'ADNc d'un gène de ménage, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) dont l'expression est considérée comme stable dans les cellules permettant de comparer les niveaux d'expression. Nous avons utilisé cette technique pour mesurer le niveau d'expression des ARN messagers au cours de nos expériences de transfection des HUVECs avec des siRNA.

8.1 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux des cultures de cellules HUVECs ont été extraits à l'aide du kit NucleoSpin RNA XS kit (Machery-Nagel, Düren, Allemagne).

Les HUVECs préalablement transfectées ou non, ensemencées à 2×10^5 cellules/puits dans une plaque 96 puits, sont lysées sur glace afin de limiter l'action des RNAses dans un tampon de lyse RA1 additionné d'un agent réducteur Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). Les lysats sont congelés directement à -80°C . Les contaminants protéiques sont éliminés grâce à une première étape de filtration sur colonne puis les acides nucléiques sont adsorbés sur une autre colonne composée de silice. L'ADN génomique contaminant est digéré grâce à l'action de DNaseI fournie avec le kit. Enfin, après plusieurs étapes de lavage, les ARN sont élués dans 13 μl d'eau sans nucléases et conservés à -80°C . La concentration en ARN totaux est mesurée grâce au NanoDropTM 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware) et leur pureté est évaluée après ajout d'un tampon de charge grâce à leur migration sur gel d'agarose 1%.

8.2 Transcription inverse

Cette étape consiste à transcrire de manière inverse l'ensemble des ARN précédemment extraits. Pour cela 0,7 μl d'hexamères de séquence aléatoire (Invitrogen Carlsbad, Californie) à 200 ng/ μl sont hybridés sur les ARN totaux (2 μg dans 12,3 μl) afin de servir d'amorces lors de l'élongation, grâce à une étape de chauffage à 70°C pendant 5 min, puis de refroidissement à 4°C pendant 3 min au thermocycleur GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Afin de s'assurer de l'absence de contamination par de l'ADN génomique, une condition contrôle est réalisée en remplaçant les ARN par 12,3 μl d'eau sans nucléases (RT-).

| Gene (RefSeq) | Species specificity | Primer sense | Primer Sequence (5' > 3') | Amplicon Size |
|----------------------------|------------------------|-----------------|---------------------------|------------------|
| GAPDH NM_002046 | Human | Forward | TGCACCACCAACTGCTTAGC | 87 pb |
| | | Reverse | GGCATGGACTGTGGTCATGAG | |
| Tyro 3 NM_006293 | Human | Forward | GCAAGCCTTTGACAGTGTGATGG | 130 pb |
| | | Reverse | GTTTCATCGCTGATGCCCAAGCT | |
| Axl NM_021913 | Human | Forward | GTTTGGAGCTGTGATGGAAGGC | 120 pb |
| | | Reverse | CGCTTCACTCAGGAAATCCTCC | |
| Mer NM_006343 | Human | Forward | CAGGAAGATGGGACCTCTCTGA | 114 pb |
| | | Reverse | GGCTGAAGTCTTTCATGCACGC | |

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des couples d'amorces utilisés pour la qPCR

Un « prémélange » composé de 1 µl de déoxynucléotides triphosphates (dNTPs, Promega, Madison, Wisconsin) à 10 mM, de 1 µl d'enzyme transcriptase inverse SuperScript II à 200 U/µl (Invitrogen Carlsbad, Californie), de 1 µl de DTT à 0,1 M (dithiothreitol) et de 4 µl de tampon 5 X fournis avec l'enzyme, est préparé pour chaque tube. La transcription inverse est ensuite réalisée grâce au thermocycleur GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) selon le protocole ci-dessous :

- 25°C pendant 10 min : activation la SuperScriptII.
- 42°C pendant 50 min : température optimale d'élongation du brin d' l'ADN complémentaires (ADNc).
- 95°C pendant 15 min : déshybridation des brins d'ARN et d'ADNc synthétisés.

8.3 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel

Le principe de cette expérience est similaire à celui de la PCR classique. Deux amorces spécifiques d'un gène cible sont utilisées afin d'amplifier spécifiquement l'ADNc d'intérêt dans lequel s'intercale un agent fluorescent (SYBRGREEN). La mesure de la fluorescence réalisée à chaque cycle est directement corrélée à la quantité d'amplicons, ainsi plus il y aura d'amplicons, plus la fluorescence émise sera forte. Un mélange réactionnel de 20 µl composé de 5 µl d'ADNc (dilués au 1/2,5), de 4,8 µl d'eau sans nucléases, de 0,1 µl d'amorce sens et anti-sens (tableau 9) à 25 µM et de 10 µl de SYBRGREEN PCR Master Mix 2X (contenant l'agent intercalant, la Taq polymérase, les dNTPs ainsi que le tampon d'activité optimale de l'enzyme ; Applied Biosystems Courtaboeuf, France) est préparé pour chaque puits d'une plaque 96 puits MicroAmp (Applied biosystems, Courtaboeuf, France). Chaque dépôt est réalisé en duplicats ou en triplicats afin d'évaluer les variations dues aux dépôts. Pour chaque couple d'amorces, 3 conditions sont réalisées : un blanc dans lequel les ADNc sont remplacés par de l'eau sans nucléases, un contrôle négatif de la transcription inverse (RT-), comme expliqué précédemment et la condition à tester.

La détection de la fluorescence émise au cours du temps par les ADNc amplifiés est réalisée avec l'appareil GeneAmp7500 Fast (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) selon le protocole suivant :

- 50°C pendant 2 min : activation de l'UNG (Uracil N-Glycosylase) ampérase afin d'éliminer les ADNc contenant des dUTPs.
 - 95°C pendant 10 min : dénaturation des doubles brins d'ADNc pour les rendre simple brin.
- 40 cycles {
- 90°C pendant 15 s : dénaturation des brins d'ADNc.
 - 60°C pendant 1 min : hybridation des amorces et élongation du brin d'ADN et mesure de la fluorescence.
 - Augmentation progressive de la température de 60°C à 95°C par paliers toutes les 30 s afin de vérifier la présence d'un unique produit d'amplification (amplicon) pour chaque couple d'amorces grâce à la courbe de fusion.

L'analyse des résultats a été réalisée grâce au logiciel 7500 Software V2.0.6 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Le Ct (« Cycle threshold » ou cycle seuil) correspond au nombre de cycles de PCR quantitative en temps réel nécessaire pour qu'un échantillon émette une fluorescence permettant d'atteindre une valeur seuil (0,4) fixée dans la partie supérieure de la phase linéaire de l'amplification (figure 46A). Le taux d'expression du gène d'intérêt est ensuite normalisé par rapport au taux d'expression d'un gène endogène de référence dont l'expression ne varie pas. Pour notre étude, nous avons choisi la GAPDH comme gène de référence. La normalisation se fait en calculant la différence entre le Ct du gène d'intérêt et le Ct du gène de référence (GAPDH) selon la formule suivante : $\% \text{ GAPDH} = 2^{-(\text{Ct}_{\text{gène d'intérêt}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}})}$.

8.4 Validation des amorces utilisées au cours des expériences de PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Nous avons validé les paramètres d'amplification et de spécificité pour chacun des couples d'amorces utilisés (tableau 8). Plusieurs paramètres ont ainsi été vérifiés :

- Dans un premier temps, la spécificité d'amplification des amorces a été testée par présence d'un pic unique sur la courbe de fusion (figure 46A). Cette analyse est complétée par une migration des amplicons sur gel d'agarose à 2% (figure 46B) montrant la présence d'un unique produit d'amplification comme le suggérait la courbe de fusion.
- Dans un deuxième temps, l'efficacité de l'amplification des amorces a été vérifiée, par dilutions successives au 1/10^{ème} des ADNc.

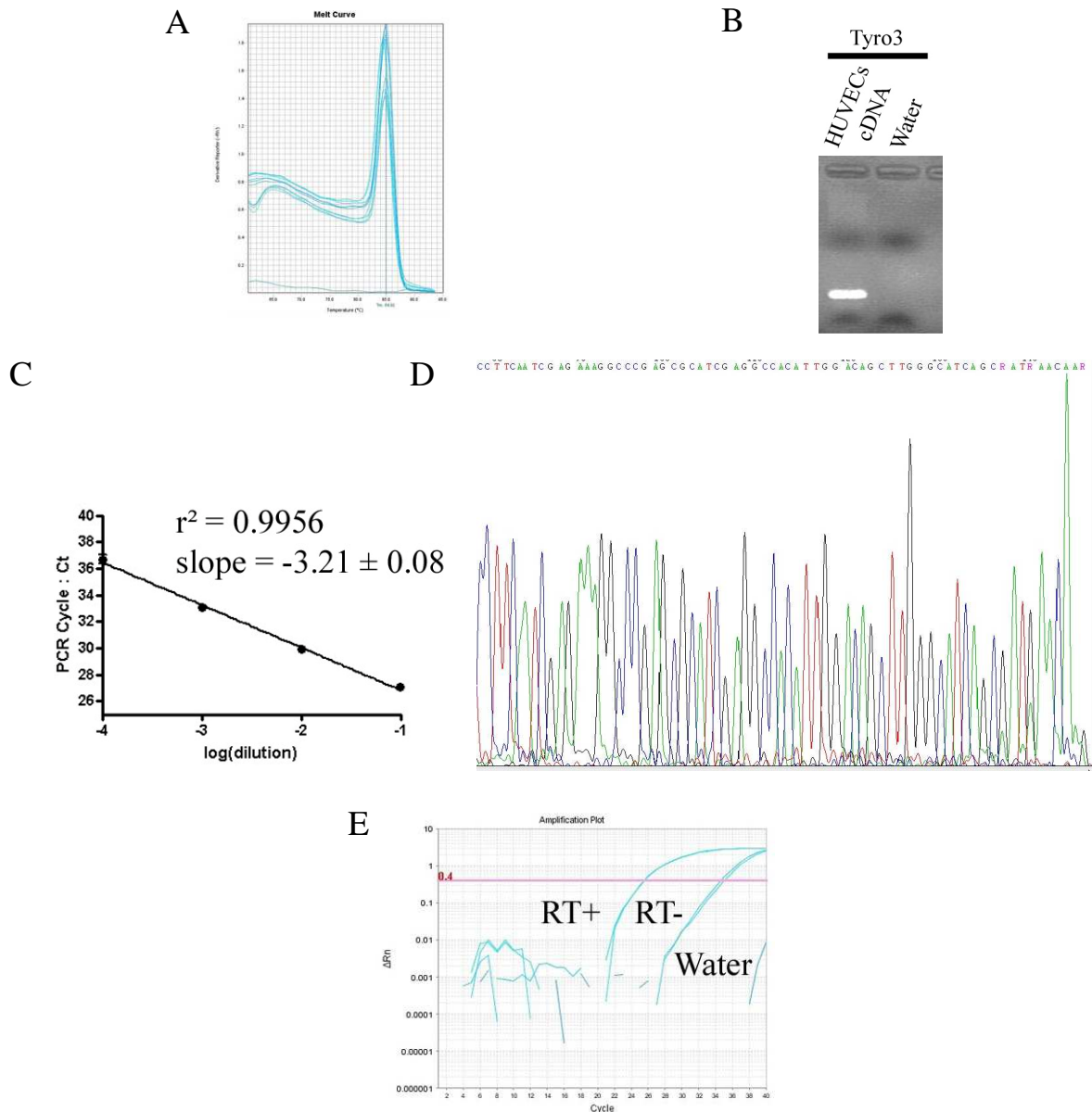


Figure 46 : Validation des amorces pour les expériences de PCR quantitative en temps réel (qPCR), exemple du récepteur tyrosine kinase Tyro3

(A) Courbes de fusions obtenues par qPCR avec de l'eau, ou après RT+, ou après RT-.

(B) Migration sur gel d'agarose à 2% des amplicons (produits d'amplification de la qPCR).

(C) Vérification de la linéarité de l'amplification après dilution en cascade des ADNc au $1/2,5^{\text{ème}}$, $1/25^{\text{ème}}$, $1/250^{\text{ème}}$, $1/2500^{\text{ème}}$. La droite correspond au Ct (cycle threshold ou cycle seuil) en fonction du log10 des dilutions précédentes.

(D) Séquence des amplicons obtenue après séquençage puis vérification avec la base de données BLAST.

(E) Courbes d'amplifications obtenues par qPCR avec de l'eau (Water), ou avec les matrices (ADNc) obtenues après rétro-transcription avec l'enzyme Superscript II (RT+) ou non (RT-).

La linéarité de l'amplification des amorces est testée par régression linéaire. En effet, la quantité d'amorces synthétisées doublant à chaque cycle, cela signifie que pour une dilution au $1/10^{\text{ème}}$, la pente de la droite représentant le Ct (cycle threshold) en fonction du \log_{10} des facteurs de dilution doit avoir une pente la plus proche possible de 3,3 ($2^{3,3}=10$). La figure 46C décrit ici un coefficient directeur proche de la valeur attendue avec un bon coefficient de linéarité (r^2 proche de 1). Dans le cas présenté figure 46C, la pente est de 3,2 ce qui signifie que nous admettons que nos amorces présentent 8% d'erreur. Donc, nous ne pourrions pas conclure qu'il existe une différence d'expression du gène entre deux conditions si cette différence est inférieure à 8%.

- Dans un troisième temps, nous avons vérifié la séquence des amplicons obtenus par séquençage. Pour cela la bande contenant les amplicons obtenus suite à la migration sur gel d'agarose à 2% (figure 46B) a été découpée puis les amplicons ont été extraits du gel, et purifiés grâce au kit QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). La réaction de séquençage a ensuite été réalisée selon la méthode de Sanger en utilisant le kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems) contenant des dNTPs fluorescents et à l'aide du séquenceur 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Les séquences obtenues (figure 46D) ont été comparées à celles référencées par la base de données Blast.

- Enfin, nous nous sommes assurés de la spécificité de l'amplification des ADNc issus de la transcription inverse des ARNm extraits à partir des cellules endothéliales. La figure 46A ne montre aucune amplification lorsque les ADNc sont remplacés par de l'eau. Il n'y a donc aucun bruit de fond dû au diluant des ADNc (blanc). En revanche, nous avons constaté une amplification non spécifique pour l'échantillon RT- au delà de 34 cycles, considérée comme négligeable (figure 46E). Cette amplification pourrait correspondre à une amplification non spécifique de l'ADN génomique encore présent dans l'échantillon. Enfin, nous constatons un écart de 10 cycles, correspondant à un taux d'expression de 2^{10} (soit de 1024 fois), entre les échantillons RT+ et RT- (figure 46A). Cet écart est représentatif de la spécificité de l'amplification des ADNc obtenus suite à la reverse transcription des ARNm extraits en ADNc à partir des HUVECs.

9 Mesure du taux d'expression et d'activation des protéines par Western blotting

9.1 Expression protéique

Les HUVECs soumises au protocole de transfection par petits ARN interférents (paragraphe 4) sont lavées 2 fois dans le tampon PBS puis lysées sur glace dans 60 µl de tampon de lyse non réducteur (Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Triton X100 1%, NP40 0,5%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Sodium orthovanadate 100 mM, pH=7,4) additionné d'un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche applied Science, Mannheim, Allemagne) et d'inhibiteurs de tyrosines phosphatases (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri). Les lysats sont vortexés 2 fois pendant 5 s, puis centrifugés à 13200 rpm pendant 10 min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Après cette étape, les lysats sont conservés à -20°C. La concentration protéique est déterminée par rapport à une gamme standard de BSA suivant la méthode colorimétrique améliorée de Lowry⁵³⁶ à l'aide du kit DC protein assay (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, Californie) à 750 nm. Des quantités de protéines équivalentes pour chaque protéine étudiée (5 µg pour Axl, 15 µg pour Mer, 25 µg pour SHP2, 20 µg pour SHP1) ont ensuite été mélangées à un tampon réducteur de Laemmli (Tris-HCl 60 mM pH=6,8, SDS 2%, β-mercaptoéthanol 5%, Glycérol 10%, Bleu de Bromophénol 0,01%) qui permettra la dénaturation des protéines.

Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide (électrophorèse SDS- PAGE). Les protéines dénaturées pendant 5 min à 100°C grâce au tampon réducteur Laemmli sont soumises à une étape de concentration dans un gel de concentration (polyacrylamide 4%, Tris-HCl 125 mM pH=6,8, SDS 0,1%) pendant 30 min à 70V constant puis séparées dans un gel de séparation (polyacrylamide 8 ou 10% en fonction de la taille des protéines, Tris-HCl 375 mM pH=8,8, SDS 0,1%) pendant 30 min à 90V puis pendant 1 h à 110V constant dans un tampon d'électrophorèse (Tris-HCl 25 mM, Glycine 185 mM, SDS 0,1%, pH=8,3) à 4°C. les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF, Millipore, Eschborn, Allemagne) pendant 2 h à 70V constant à 4°C dans un tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM, Glycine 185 mM, SDS 0,02%, méthanol 20%). Les sites non spécifiques de la membrane sont ensuite saturés pendant 2 h à température ambiante dans la solution de blocage indiquée pour l'anticorps choisi (tableau 10).

| Protéines cibles | Fournisseurs | Références | Espèces | Dilution | Tampons de blocage |
|--|----------------|------------|---------|---------------------|---------------------------------|
| Axl | Santa Cruz | C-20 | chèvre | 1/500 | TBS-tween 0,1%-lait 5% - BSA 5% |
| phospho-Axl Tyr ⁷⁷⁹ | R&D Systems | AF2228 | lapin | 1/500 | TBS-tween 0,1%-lait 5% - BSA 5% |
| Mer | Abcam | Ab52591 | souris | 1/1000 | TBS-tween 0,1%-lait 5% |
| | FabGennix | MKT-101AP | lapin | 1/500 | TBS-tween 0,1%-lait 5% - BSA 5% |
| phospho-Mer Tyr ⁷⁴⁹⁻⁷⁵³⁻⁷⁵⁴ | Cell Signaling | PMKT-140AP | lapin | 1/1000 | TBS-tween 0,1%-lait 5% - BSA 5% |
| VEGFR-2 | Cell Signaling | 2479 | lapin | 1/1000 | TBS-tween 0,1%-lait 5% |
| phospho-VEGFR-2 Tyr ¹¹⁷⁵ | Cell Signaling | 2478 | lapin | 1/1000 | TBS-tween 0,1%-BSA 5% |
| phospho-VEGFR-2 Tyr ⁹⁹⁶ | Cell Signaling | 2474 | lapin | 1/1000 | TBS-tween 0,1%-BSA 5% |
| Akt | Cell Signaling | 9272 | lapin | 1/1000 | TBS-tween 0,1%-lait 5% |
| Phospho-Akt Ser ⁴⁷³ | Cell Signaling | 9271 | lapin | 1/1000 | TBS-tween 0,1%-BSA 5% |
| Erk 1 | Santa Cruz | C-16 | lapin | 1/2000 | TBS-tween 0,1%-lait 5% |
| phospho-Erk 1/2 Thr ²⁰² -Tyr ²⁰⁴ | Santa Cruz | Sc-16982 | lapin | 1/1000 | TBS-tween 0,1%-lait 5% |
| SHP1 | BD Biosciences | 610126 | souris | 1/1000 | TBS-tween 0,1%-lait 5% |
| SHP2 | Cell Signaling | 3752 | lapin | 1/1000 | TBS-tween 0,1%-lait 5% |
| phospho-SHP2 Tyr ⁵⁴² | Cell Signaling | 3751 | lapin | 1/1000 | TBS-tween 0,1%-lait 5% |
| GAPDH | Hyttest Ltd | 5G4-6C5 | souris | 1/2x10 ⁶ | TBS-tween 0,1%-lait 5% |
| Actine | Sigma-Aldrich | A5060 | lapin | 1/5000 | TBS-tween 0,1%-lait 5% |

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés pour la technique de Western blotting

| Anticorps | Fournisseurs | Références | Espèces | Dilution | Tampons de blocage |
|------------------------|---------------|------------|---------|----------|---|
| Âne anti-chèvre-HRP | Santa Cruz | sc-2020 | âne | 1/8000 | Tampon de blocage de l'anticorps primaire |
| Chèvre anti-lapin-HRP | Sigma-Aldrich | A0545 | chèvre | 1/10000 | |
| Chèvre anti-souris-HRP | Sigma-Aldrich | A0168 | chèvre | 1/10000 | |

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des anticorps secondaires utilisés pour la technique de Western blotting

Enfin, la membrane est incubée en présence des anticorps primaires dirigés contre le fragment peptidique de la protéine d'intérêt dilué dans la solution de blocage (tableau 10) toute la nuit à 4°C sous rotation.

Le lendemain, les membranes sont lavées 4 fois 5 min dans une solution saline tamponnée au tris (Tris-Buffered Saline, TBS : Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM, pH=7,4) – additionnée de tween-20 0,1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) afin d'éliminer l'excès d'anticorps primaires non fixé sur l'antigène. Les membranes sont ensuite incubées 1 h30 sous agitation, à température ambiante, avec des anticorps secondaires dirigés contre l'espèce chez laquelle a été produit l'anticorps primaire (tableau 11) couplés à la Horse-Radish Peroxydase (HRP), dilués dans le tampon de blocage utilisé pour l'anticorps primaire (tableaux 10 et 11). Enfin, après 4 nouveaux lavages de 5 min les protéines d'intérêt sont visualisées grâce à la lumière produite par la réaction de chimiluminescence entre la HRP couplée aux anticorps secondaires et son substrat contenu dans le kit ECL Plus Western blotting detection reagents (GE Healthcare, Amersham, Oakville, Ontario). L'acquisition du signal lumineux est réalisée grâce au système de détection LAS-3000 (Fujifilm, Cypress, Californie).

L'expression de chaque protéine d'intérêt a été normalisée par rapport à une protéine de référence : la GAPDH, grâce à la mesure de l'intensité des bandes obtenues à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, Maryland).

9.2 Activation des voies de signalisation

9.2.1 Conditions basales

Les HUVECs sontensemencées dans une plaque 12 puits à 10^5 cellules/puits/ml de milieu EGM-2. Après 24 h d'incubation, le milieu est retiré et remplacé par 500 µl de milieu EGM-2. Après 4 jours d'incubation, les cellules sont stimulées directement dans le milieu de culture désormais appauvri en facteurs de croissance avec 10 µg/ml de protéine S humaine pendant 15 min à 37°C puis pendant 5 min avec 20 ng/ml de VEGFA humain en présence ou non des inhibiteurs pharmacologiques indiqués tableau 7. Suite à la stimulation, le milieu de culture est retiré et les cellules sont directement lysées sur glace, dans 40 µl de tampon réducteur de Laemmli contenant le tampon de lyse non réducteur ainsi que les inhibiteurs de protéases et de phosphatases, puis les lysats sont congelés à -80°C. Les protéines sont dénaturées et des dépôts de 40 µl de lysats cellulaires sont réalisés sur un gel SDS PAGE.

Les cellules TM4 sontensemencées dans une plaque 12 puits à 1×10^5 cellules/puits/ml et incubées pendant 48 h à 37°C. Les TM4 sont ensuite mises en culture sans sérum pendant 24 h avec 500 µl/puits de milieu DMEMF12. Les cellules sont ensuite stimulées à différents temps avec 10 µg/ml de protéine S humaine avant d'être lysées sur glace dans 40 µl de tampon réducteur de Laemmli et les lysats sont congelés à -80°C.

9.2.2 Transfection par siRNA

Les HUVECs,ensemencées à 2×10^5 cellules/puits/ 2,3 ml de milieu EGM-2 dans une plaque 6 puits, sont incubées 24 h à 37°C. Les cellules sont ensuite transfectées avec 50 nM de siRNA contrôles ou dirigés contre les ARNm du récepteur Mer ou dirigés contre les ARNm de la protéine phosphatase SHP2. Après 24 h de transfection, les HUVECs sont cultivées sans SVF dans 2 ml de milieu EBM-2 additionné d'ITS pendant 24 h. Enfin, les cellules sont stimulées avec 10 µg/ml de protéine S pendant 15 min, avant d'être lysées dans 60 µl de tampon réducteur de Laemmli.

10 Analyses statistiques

Les données obtenues à partir d'au moins 3 expériences indépendantes, réalisées en duplicats ou en triplicats sont exprimées en valeur moyenne ou en pourcentage moyen des valeurs contrôles \pm écart type (SD, Standard Deviation) ou erreur standard de la moyenne (SEM, Standard Error of the Mean) selon l'expérience réalisée. La distribution des données a tout d'abord été testée grâce au test de Shapiro-Wilk, les données ont ensuite été analysées par analyse de variance (ANOVA, ANalysis Of Variance) suivi du test post-hoc de Dunnett si la distribution des échantillons suit la loi normale ou par le test de Kruskal-Wallis si la distribution des échantillons ne suit pas la loi normale. Lorsque cela est indiqué, les valeurs entre les groupes ont été considérées comme statistiquement significative pour une valeur $P < 0,05$. Les valeurs de P sont exprimées comme indiqué ci-après : *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,5$; « ns » signifie que la différence n'est pas statistiquement significative.

Les analyses statistiques ont toutes été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism 5 pour le système d'exploitation Windows (Graphpad, San Diego, Californie).

Résultats

| | |
|--|-----|
| Chapitre 1 : Inhibition de l'angiogenèse par la protéine S | 175 |
| 1 La protéine S inhibe l'angiogenèse induite par les facteurs angiogéniques <i>in vivo</i> | 175 |
| 2 La protéine S inhibe la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales <i>in vitro</i> | 179 |
| 3 La protéine S inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales dépendante du VEGFA | 181 |
| 4 Régulation de l'activation du VEGFR2 par la protéine S | 185 |
| 5 La protéine phosphatase SHP2 médie l'effet anti-angiogénique de la protéine S .. | 187 |
| 6 Rôle des récepteurs TAM dans l'effet anti-angiogénique de la protéine S | 193 |
| 7 Le récepteur Mer est essentiel pour le recrutement de la phosphatase SHP2 induite par la protéine S | 201 |
| 8 Le récepteur Mer et la protéine phosphatase SHP2 sont responsables de l'effet anti-angiogénique de la protéine S | 203 |
| 9 Conclusion : la protéine S est un inhibiteur endogène de l'angiogenèse | 205 |
| Chapitre 2 : Rôle direct de la protéine S sur les cellules endothéliales | 207 |
| 1 La protéine S induit la prolifération des cellules endothéliales et active la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 | 207 |
| 2 La protéine S active la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 via le récepteur Mer | 209 |
| 3 La protéine phosphatase SHP2 médie les effets cellulaires et moléculaires induits par la protéine S | 211 |
| 4 La protéine c-Src médie la signalisation induite par la protéine S | 215 |
| 5 Conclusion : la protéine S est un agent mitogène pour les cellules endothéliales .. | 217 |

1. La protéine S inhibe l'angiogenèse induite par les facteurs pro-angiogéniques *in vivo*

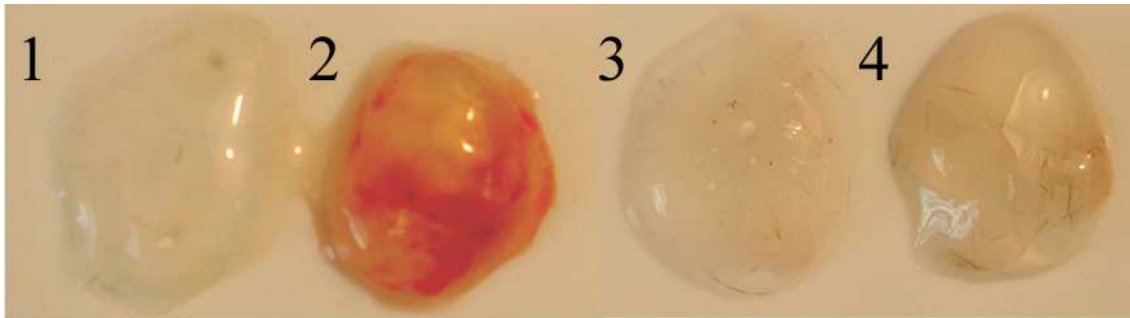


Figure 47 : La protéine S inhibe l'angiogenèse *in vivo*

Photographies représentatives de bouchons de Matrigel obtenus 7 jours après l'injection sous-cutanée de Matrigel seul (1) supplémenté avec des facteurs pro-angiogéniques murins (FGF2 à 400 ng/ml, VEGFA à 400 ng/ml, héparine 50 unités/ml) (2), ou avec de la protéine S (ProS) humaine à 25 µg/ml (3) ou avec le mélange de facteurs pro-angiogéniques et la protéine S humaine (4) (n=8).

Résultats

Chapitre 1 : Inhibition de l'angiogenèse par la protéine S

Malgré le fait que l'endothélium exprime les récepteurs TAM et constitue une source majeure de protéine S circulante, l'importance physiopathologique de la protéine S, ses interactions avec les cellules endothéliales et en particuliers son rôle lors de l'angiogenèse n'ont pas encore été étudiés. Dans ce premier chapitre, nous avons combiné des approches *in vivo* et *in vitro*, afin de rechercher le rôle joué par la protéine S lors de l'angiogenèse.

1 La protéine S inhibe l'angiogenèse induite par les facteurs angiogéniques *in vivo*

Nous avons tout d'abord utilisé un modèle *in vivo* appelé test du « bouchon de Matrigel » qui consiste à injecter une substance extraite à partir de la matrice extracellulaire de cellules tumorales (Matrigel), par voie sous-cutanée à des souris C57/BL6. Le Matrigel, liquide à 4°C, se solidifie à 37°C pour former un implant (appelé « bouchon » de Matrigel) après injection sous-cutanée. L'ajout de substance(s) pro-angiogénique(s) au Matrigel permet de recruter les vaisseaux sanguins sous-cutanés pré-existants afin d'induire sa vascularisation. Grâce à cette technique, il est possible de tester l'activité pro-angiogénique d'une molécule, simplement en la mélangeant au Matrigel et en observant sa vascularisation quelques jours plus tard. A l'inverse, il est possible de tester l'activité anti-angiogénique d'une molécule en la mélangeant à du Matrigel qui contient des facteurs pro-angiogéniques. L'analyse de la vascularisation permettra de conclure quant à l'effet anti-angiogénique de cette molécule. Nous avons ainsi injecté à des souris préalablement anesthésiées une solution de Matrigel seul (figure 47, bouchon 1) ou contenant, soit un mélange de facteurs pro-angiogéniques murins connus (VEGFA, FGF2, héparine) (figure 47, bouchon 2), soit un mélange de facteurs pro-angiogéniques additionné de protéine S (ProS) humaine (figure 47, bouchon 4), soit de la protéine S seule (figure 47, bouchon 3). Une semaine après l'injection, les souris ont été euthanasiées et la vascularisation du bouchon de Matrigel a pu être observée. Comme cela était attendu, le mélange de facteurs pro-angiogéniques a induit la vascularisation du bouchon de Matrigel (figure 47, bouchon 2) par rapport à notre condition contrôle (figure 47, bouchon 1).

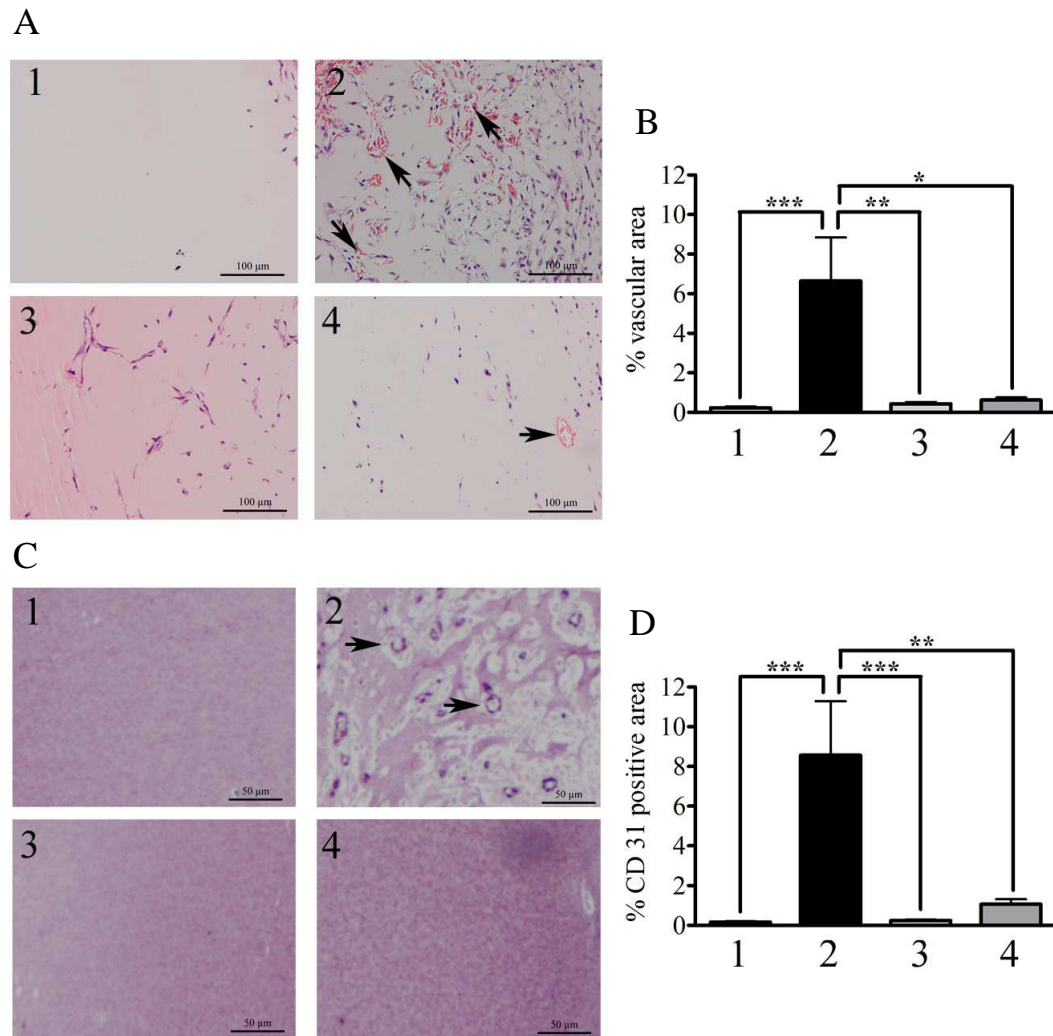


Figure 48 : La protéine S inhibe la vascularisation des bouchons de Matrigel *in vivo*

A) Photographies représentatives de coupes de 4 μm réalisées pour chacun des bouchons de Matrigel après coloration à l'hématoxyline/éosine. Les flèches indiquent des exemples de vaisseaux sanguins contenant des hématies. Les photographies ont été réalisées grâce au microscope MVX10 (Olympus), barre d'échelle : 100 μm .

B) Quantification de l'aire vasculaire rapportée à l'aire totale du bouchon pour chaque photographie grâce au logiciel Fiji-win32. Les données obtenues à partir de 3 champs aléatoires de 3 bouchons de Matrigel, sont exprimées en pourcentage moyen de l'aire vasculaire par champs \pm SEM *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ comme cela a été décrit dans une autre étude.⁵³³

C) Photographies représentatives de l'immunomarquage CD31, réalisées pour chacun des bouchons de Matrigel. Les flèches montrent des vaisseaux sanguins marqués par le CD31. Les images ont été réalisées grâce au microscope MVX10 (Olympus), barre d'échelle : 50 μm .

D) Quantification de l'aire correspondant au marquage CD31 rapportée à l'aire totale du bouchon de Matrigel pour chaque photographie grâce au logiciel Fiji-win32. Les données obtenues à partir de 3 champs aléatoires de 3 bouchons de Matrigel sont exprimées en pourcentage moyen de l'aire CD31 positive par champs \pm SEM *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ comme cela a été décrit dans une autre étude.⁵³⁴

(1) Matrigel seul (contôle).

(2) Facteurs pro-angiogéniques murins (FGF2 à 400 ng/ml, VEGFA à 400 ng/ml, héparine 50 unités/ml).

(3) Protéine S (ProS) humaine à 25 $\mu\text{g/ml}$.

(4) Facteurs pro-angiogéniques additionnés de protéine S (ProS) humaine à 25 $\mu\text{g/ml}$.

Nous avons constaté que la protéine S n'est pas capable d'induire seule la vascularisation du bouchon (figure 47, bouchon 3). En revanche, elle est capable d'inhiber la vascularisation induite par les facteurs pro-angiogéniques (figure 47, bouchon 4). Afin d'analyser la vascularisation des bouchons de Matrigel dans les différentes conditions, nous avons coloré à l'hématoxyline/éosine des coupes de 4 μm (figure 48A). Les résultats confirment, d'une part, l'absence de vaisseaux sanguins observée macroscopiquement en condition contrôle (figure 48A, image 1), et d'autre part, la présence de vaisseaux sanguins en présence des facteurs pro-angiogéniques, identifiables par la présence d'hématies dans leur lumière (figure 48A, image 2, flèches). En présence simultanée de protéine S et de facteurs pro-angiogéniques, nous avons observé une diminution significativement de 90% de la surface occupée par les vaisseaux sanguins (figure 48A, image 4). La protéine S seule n'a quant à elle pas eu d'effet sur l'angiogenèse (figure 48A, image 3).

La présence des cellules endothéliales dans les bouchons de Matrigel a été confirmée par immunohistochimie en utilisant des anticorps dirigés contre le marqueur spécifique des cellules endothéliales : CD31 (ou PECAM-1) sur chaque coupe. Les résultats de cette expérience montrent comme précédemment une inhibition significative de 90% de la présence des cellules endothéliales lorsque la protéine S est ajoutée aux facteurs pro-angiogéniques (figures 48C et D).

Ces résultats montrent que la protéine S exerce un effet anti-angiogénique *in vivo*.

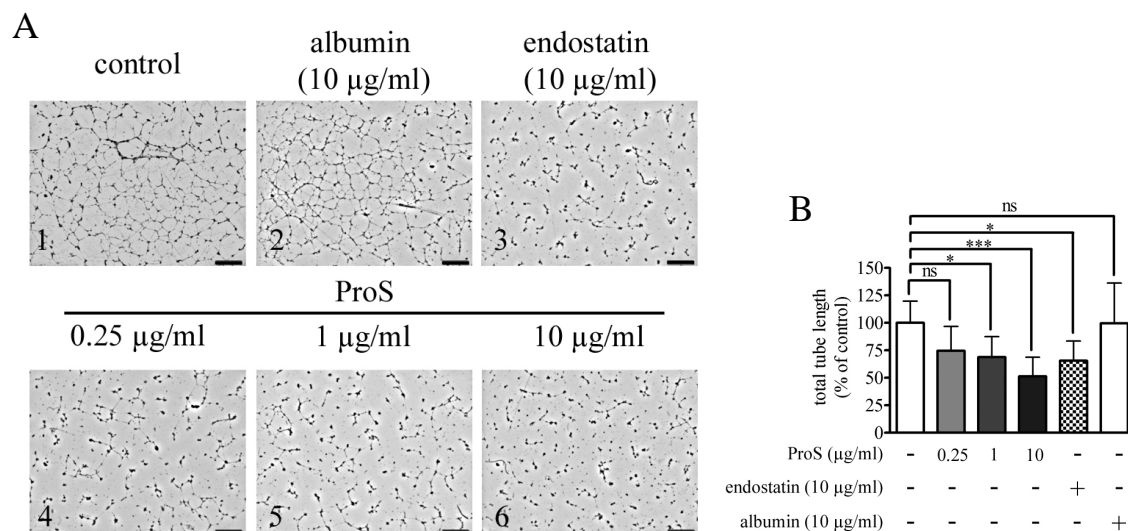


Figure 49 : La protéine S inhibe la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales *in vitro*

A) Photographies représentatives du réseau formé par les HUVECs sur Matrigel seul (1) ou supplémenté avec de l'albumine humaine à 10 µg/ml (2), avec de l'endostatine à 10 µg/ml (3), avec différentes concentrations de protéine S (ProS) 0,25 µg/ml (4), 1 µg/ml (5) et 10 µg/ml (6) (n=4 en duplicats). Les photographies du réseau ont été réalisées grâce au microscope MVX10 (Olympus), barre d'échelle : 1 mm.

B) Quantification de la longueur totale du réseau formé par les HUVECs grâce au logiciel Angioquant comme cela a été décrit dans une autre étude.⁵³⁵ Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la longueur du réseau par rapport au contrôle ± SD ***p<0,001 ; **p<0,01 ; *p<0,05 ; ns : non significatif (n=4 en duplicats).

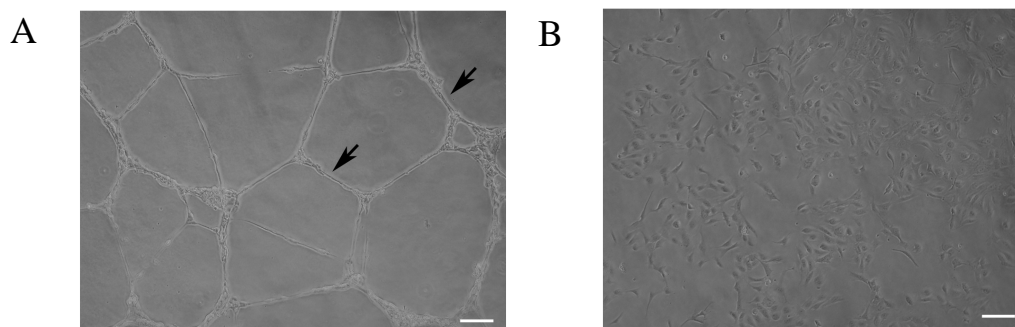


Figure 50 : Le VEGFA est essentiel à la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales *in vitro*

Photographies représentatives du réseau formé par les cellules endothéliales sur Matrigel seul (A) ou traitées avec des anticorps anti-VEGFR2 humain à 10 µg/ml (B). Les flèches montrent des exemples de formation de structures capillaires. Les photographies ont été réalisées grâce au microscope MVX10 (Olympus), barre d'échelle : 100 µm.

2 La protéine S inhibe la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales *in vitro*

Les cellules endothéliales constituent le principal type cellulaire impliqué lors de l'angiogenèse. L'ensemencement des cellules endothéliales (HUVECs) sur une matrice extracellulaire (Matrigel), induit spontanément la formation d'un réseau capillaire (figure 49A image 1). Nous avons ainsi démontré que la protéine S inhibe la formation de ce réseau capillaire de manière dose-dépendante (figure 49). A 0,25 µg/ml, la protéine S n'a pas d'effet sur la formation du réseau capillaire (figure 49A, image 4 et figure 49B). A 1 µg/ml, la protéine S inhibe la formation du réseau capillaire de plus de 25% (figure 49A, image 5 et figure 49B) et de plus de 50% à 10 µg/ml (figure 49A, image 6 et figure 49B). Nous avons constaté que cet effet inhibiteur est comparable à celui obtenu avec l'endostatine, un inhibiteur connu de l'angiogenèse, utilisé dans ce test comme contrôle positif. Enfin, l'albumine humaine, une autre protéine plasmatique de même poids moléculaire que la protéine S (69 kDa), n'a pas d'effet sur la formation du réseau capillaire à 10 µg/ml (figure 49A, image 2 et figure 49B) traduisant la spécificité d'action de la protéine S.

Ces données montrent que la protéine S à la concentration de 10 µg/ml inhibe la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales de manière comparable à un inhibiteur connu de l'angiogenèse : l'endostatine.

Nous avons ensuite vérifié que la formation du réseau capillaire est dépendante du VEGFA, le principal facteur de croissance impliqué lors de l'angiogenèse. Le traitement des cellules endothéliales avec des anticorps bloquant l'activation du principal récepteur du VEGFA, le VEGFR2, montre une forte inhibition de la formation spontanée du réseau capillaire (figure 50B) par rapport au contrôle (figure 50A). Cette observation nous a amené à nous questionner sur le rôle joué par la protéine S dans de la signalisation induite par le VEGFA.

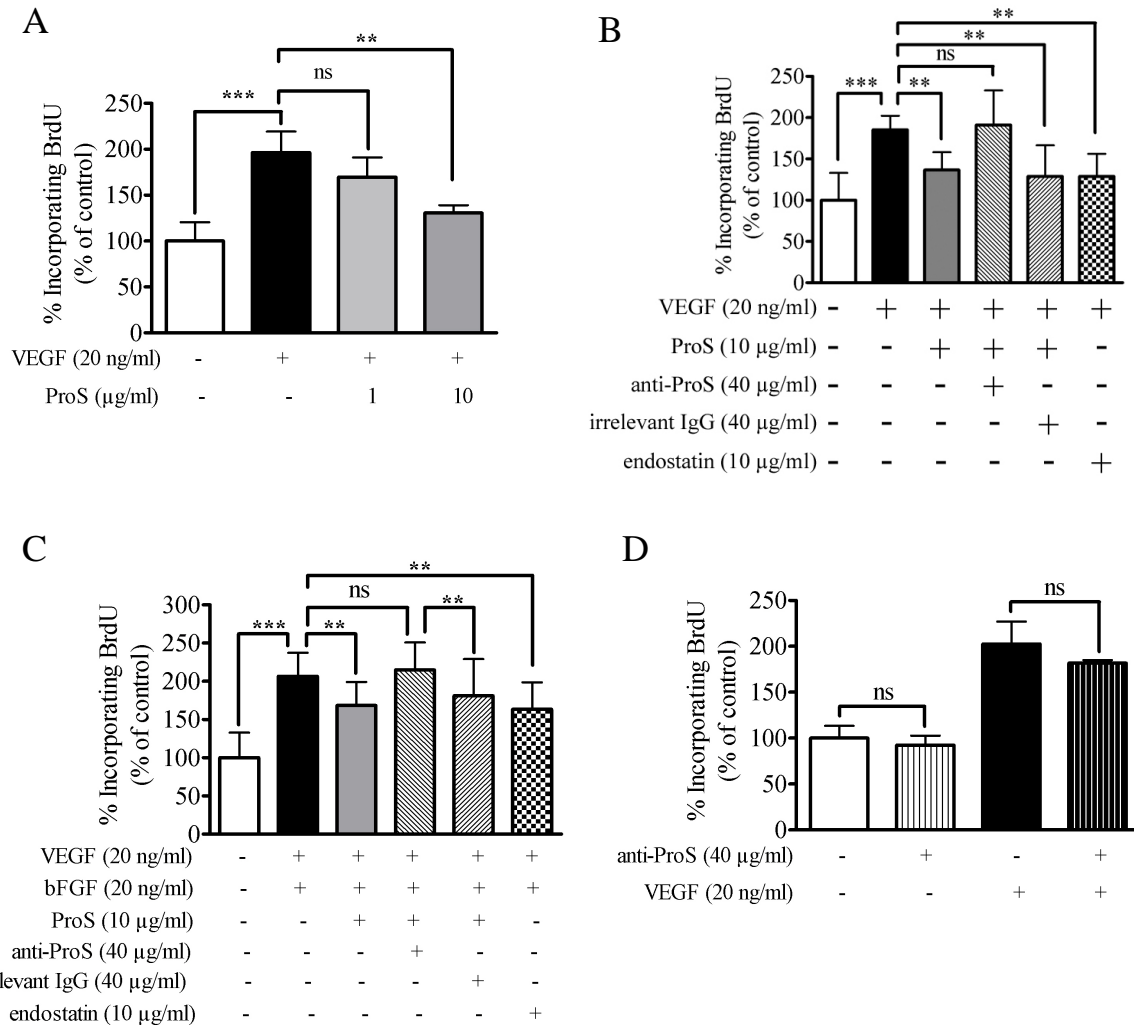


Figure 51 : La protéine S inhibe la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA

(A) La prolifération des HUVECs a été évaluée par mesure du taux d'incorporation de BrdU après 24 h de traitement en présence ou non de VEGFA (20 ng/ml) additionné ou non de protéine S (ProS) humaine à 1 ou à 10 μg/ml. Les données sont exprimées en pourcentage moyen du taux d'incorporation de BrdU du contrôle ± SD ***p<0,001 ; **p<0,01 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

La protéine S a été préalablement neutralisée grâce à l'utilisation des anticorps anti-protéine S (Dako) ou d'IgG contrôles provenant de la même espèce que l'anticorps anti-protéine S, 1 h avant le traitement avec le VEGFA (B) ou avec le VEGFA et le FGF2 (bFGF) (C). Les données sont exprimées en pourcentage moyen du taux d'incorporation de BrdU du contrôle ± SD ***p<0,001 ; **p<0,01 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

(D) La prolifération des HUVECs a été évaluée par mesure du taux d'incorporation de BrdU après 24 h de traitement en présence des anticorps anti-protéine S (Dako) additionné ou non de VEGFA (20 ng/ml). Les données sont exprimées en pourcentage moyen du taux d'incorporation de BrdU du contrôle ± SD ns : non significatif (n=3 en triplicats).

3 La protéine S inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales dépendante du VEGFA

Nous avons démontré que la formation du réseau capillaire est dépendante de la signalisation du VEGFR2 induite par le VEGFA et que cette angiogenèse *in vitro* est inhibée par la protéine S. Nous nous sommes alors intéressés au rôle joué par la protéine S au cours de deux étapes clés de la mise en place du réseau capillaire, la prolifération et la migration des cellules endothéliales médiées par le VEGFA.^{4,18,76,530,537}

3.1 La protéine S inhibe la prolifération des cellules endothéliales dépendante du VEGFA

Dans une première expérience nous avons testé les effets de la protéine S sur la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA. Le traitement des cellules endothéliales avec 20 ng/ml de VEGFA humain recombinant, augmente d'environ 2 fois le taux d'incorporation de la BrdU par les cellules endothéliales (figure 51A). La protéine S n'a pas d'effet significatif sur la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA à 1 µg/ml (figure 51A). En revanche, à 10 µg/ml, la protéine S diminue significativement de 50% la prolifération des cellules endothéliales (figure 51A). Nous avons alors décidé de conserver seulement la concentration pour laquelle l'effet de la protéine S est observé, soit 10 µg/ml, pour la suite de nos expérimentations. Dans une deuxième expérience, nous avons démontré que l'effet inhibiteur observé est bien spécifique à la protéine S. Comme le montre la figure 51B, la neutralisation de la protéine S avec des anticorps spécifiques dirigés contre celle-ci a permis de réverser l'effet anti-prolifératif observé. Cet effet est spécifique à la protéine S puisque le prétraitement avec des immunoglobulines G (IgG) contrôles produites chez la même espèce que les anticorps anti-protéine S n'a pas affecté l'effet anti-prolifératif de la protéine S. De nouveau, comme cela était le cas au cours des expériences de formation du réseau capillaire, nous constatons que l'effet inhibiteur exercé par la protéine S est comparable à l'endostatine (figure 51B). L'effet inhibiteur de la protéine S est aussi observé lorsque la prolifération des HUVECs est stimulée simultanément par du VEGFA et du FGF2 (figure 51C). Des études précédentes ayant démontré la capacité des cellules endothéliales à sécréter la protéine S,^{404,407} nous avons testé le rôle joué par cette sécrétion endogène sur la prolifération des cellules endothéliales. Le traitement à l'aide d'anticorps anti-ProS n'a affecté ni la prolifération endogène des cellules endothéliales, ni la prolifération induite par le VEGFA (figure 51D).

3. La protéine S inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales dépendante du VEGFA

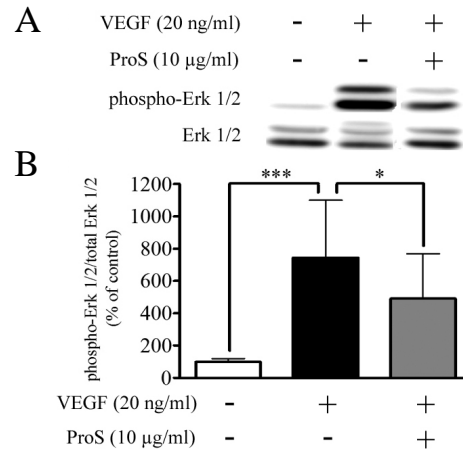


Figure 52 : La protéine S inhibe l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induite par le VEGFA

(A) Western blot représentatif de la phosphorylation de Erk 1/2 Thr²⁰² et Tyr²⁰⁴ dans les HUVECs obtenu après 15 min de stimulation avec la protéine S (ProS à 10 µg/ml) puis 5 min de traitement avec le VEGFA (20 ng/ml). Un Western blot anti-Erk 1/2 total a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées. Les HUVECs ont été préalablement carencées en Sérum de veau Fœtal (SVF) pendant 24 h.

(B) Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines Erk 1/2 phosphorylées rapporté à la quantité de protéines Erk 1/2 totale en condition contrôle ± SD ***p<0,001 ; *p<0,05 (n=4 en triplicats).

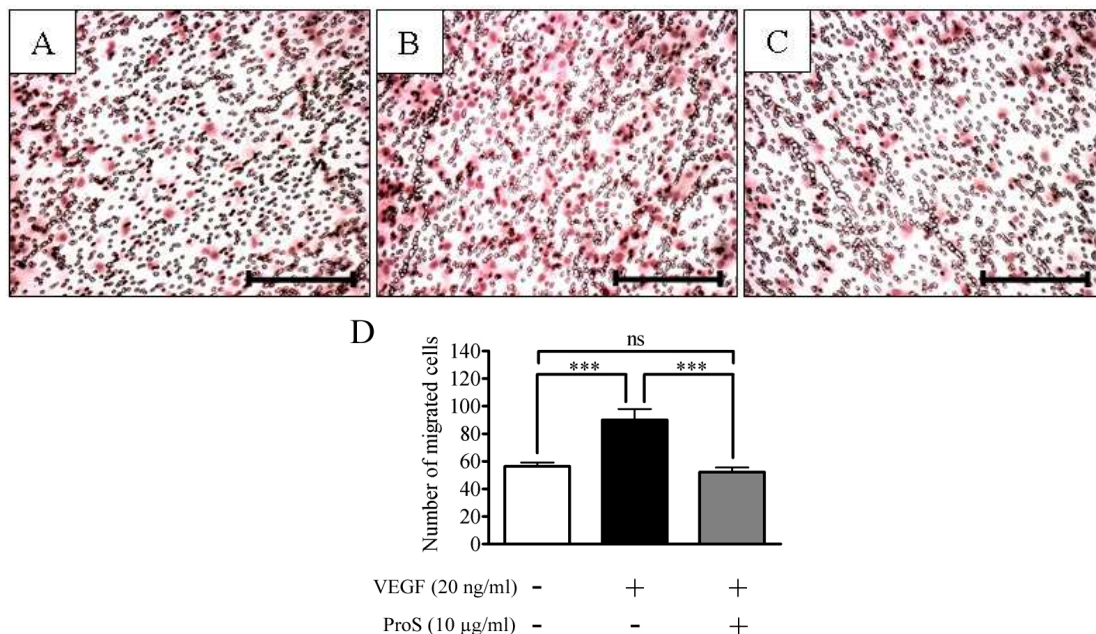


Figure 53 : La protéine S inhibe la migration des cellules endothéliales dépendante du VEGFA

Photographies représentatives des HUVECs ayant migré après 4 h de traitement en absence (A) ou en présence de VEGFA à 20 ng/ml (B), supplémenté avec 10 µg/ml de protéine S (ProS) (C). Les cellules migrantes, colorées à l'Hémaroxyline/Eosine, ont été photographiées à l'aide d'un microscope (Zeiss).

Barre d'échelle : 50 µm.

(D) Quantification du nombre de cellules ayant migré à partir de 15 champs choisis aléatoirement pour chaque filtre. Les données sont exprimées en nombre moyen de cellules ayant migré ± SD ***p<0,001 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

Ces résultats montrent que la sécrétion endogène de protéine S n'influence pas la prolifération des cellules endothéliales.

L'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 représente une étape importante dans la signalisation induite par le VEGFA pouvant conduire à la prolifération des cellules endothéliales.^{76,82,538} Nous nous sommes intéressés à la régulation de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 dépendante du VEGFA par la protéine S. Le Western blot (figure 52A) et sa quantification (figure 52B) montrent que le VEGFA augmente le taux de phosphorylation des protéines Erk 1/2 de 7 fois par rapport à la condition contrôle. Cette activation de Erk 1/2 induite par le VEGFA est inhibée significativement d'environ 50% par le prétraitement avec la protéine S (figures 52A et B). Ces données sont en parfait accord avec les résultats précédemment obtenus montrant une inhibition partielle de la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA.

L'ensemble de ces résultats montre que la protéine S inhibe à la fois la prolifération des cellules endothéliales et l'activation de la voie de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2 induites par le VEGFA.

3.2 La protéine S inhibe la migration des cellules endothéliales dépendante du VEGFA

Suite à l'étape précoce de prolifération, les cellules endothéliales migrent sous l'effet des facteurs de croissance tels que le VEGFA. Nous nous sommes donc intéressés au rôle joué par la protéine S lors de la migration des cellules endothéliales induite par le VEGFA *in vitro*. La figure 53A montre que les cellules endothéliales migrent spontanément dans les conditions basales. En présence de VEGFA à 20 ng/ml, on observe que le nombre de cellules endothéliales migrantes augmente significativement de plus de 40% (figures 53B et D). Cette migration dépendante du VEGFA est totalement inhibée par l'ajout de la Protéine S à 10 µg/ml (figures 53C et D).

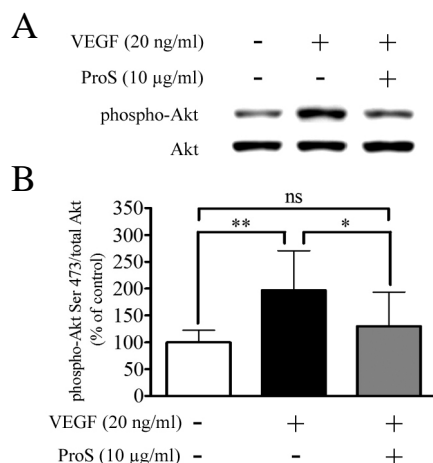


Figure 54 : La protéine S inhibe l'activation de la voie de la PI3Kinase/Akt dépendante du VEGFA

(A) Western blot représentatif de la phosphorylation de Akt sur la sérine Ser⁴⁷³ dans les HUVECs après 15 min de stimulation avec la protéine S (ProS à 10 µg/ml) ou sa solution de dilution, puis 5 min de traitement avec le VEGFA (20 ng/ml). Un Western blot anti-Akt total a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées. Les HUVECs ont été préalablement carencées en SVF pendant 24 h.

(B) Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines Akt phosphorylées Ser 473 rapporté à la quantité de protéines Akt totale en condition contrôle ± SD **p<0,01 ; *p<0,05 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

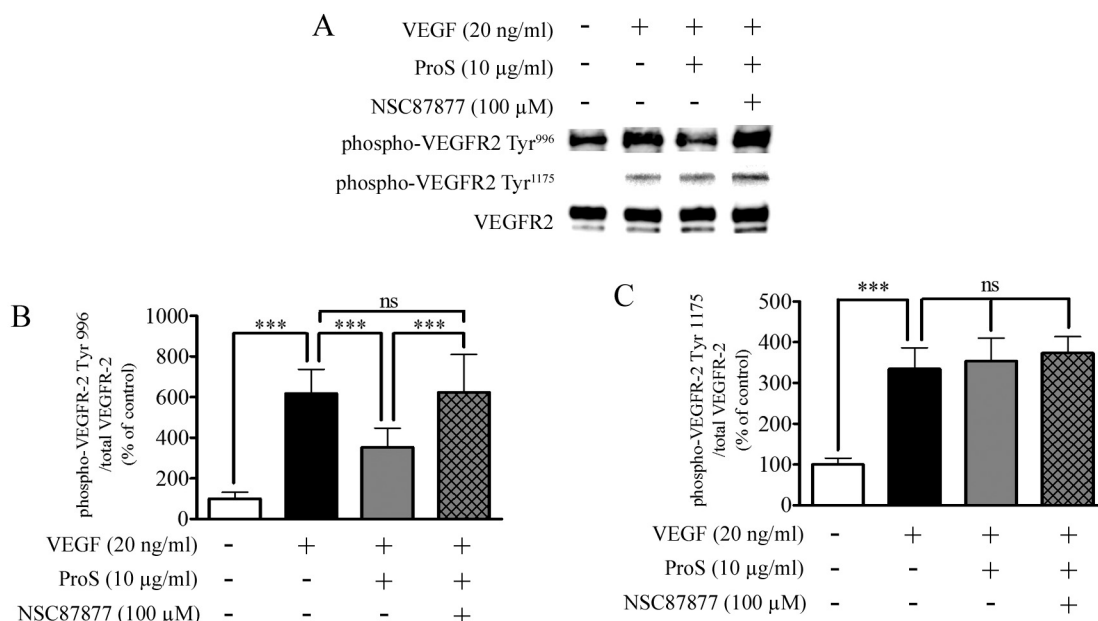


Figure 55 : La protéine S inhibe la phosphorylation VEGFR2 induit par le VEGFA

(A) Western blot représentatif de la phosphorylation du VEGFR2 Tyr 996 ou 1175 dans les HUVECs après 15 min de stimulation avec la protéine S (ProS à 10 µg/ml) ou sa solution de dilution, puis 5 min de traitement avec le VEGFA (20 ng/ml). Un Western blot anti-VEGFR2 total a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées. Les HUVECs carencées en SVF pendant 24 h ont été pré-traitées pendant 3h avec l'inhibiteur NSC87877 à 100 µM ou avant d'être stimulées avec la protéine S puis le VEGFA.

Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines VEGFR2 phosphorylées Tyr 996 (B) ou 1175 (C) rapporté à la quantité de protéines VEGFR2 totale en condition contrôle ± SD ***p<0,001 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

La voie de signalisation de la PI3K qui conduit à la phosphorylation de Akt sur la Ser⁴⁷³, est particulièrement importante au cours de la migration endothéliales dépendante du VEGFA.^{82,538-541} Ainsi, comme le montre les figures 54A et B, le VEGFA augmente de 2 fois le taux de phosphorylation des protéines Akt sur la Ser⁴⁷³. Le traitement avec la protéine S à 10 µg/ml inhibe totalement cette phosphorylation de Akt sur la Ser⁴⁷³ induite par le VEGFA.

Ces résultats montrent que la protéine S inhibe à la fois la migration des cellules endothéliales et l'activation de la voie de signalisation de la PI3K induites par le VEGFA.

4 Régulation de l'activation du VEGFR2 par la protéine S

Nous avons démontré que la protéine S inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales induite par le VEGFA, ainsi que les voies de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2 et de la PI3K induites par le VEGFA. Ces événements cellulaires étant sous la dépendance de l'activation du VEGFR2 par le VEGFA, nous nous sommes intéressés au rôle joué par la protéine S sur l'activation du VEGFR2 induite par le VEGFA. L'activation du VEGFR2 par le VEGFA conduit à sa phosphorylation sur de nombreux résidus tyrosine.^{76,82} Nous avons focalisé notre attention sur les résidus Tyr¹¹⁷⁵ et Tyr⁹⁹⁶, connus pour médier la signalisation de la PI3K/Akt et des MAP-Kinases Erk 1/2.^{82,135,139} Dans ces conditions, le VEGFA a bien induit la phosphorylation du VEGFR2 sur le site Tyr⁹⁹⁶ (figures 55A et B) ainsi que sur le site Tyr¹¹⁷⁵ (figures 55A et C). Après le prétraitement avec la protéine S à 10 µg/ml, la phosphorylation induite par le VEGFA du résidu Tyr⁹⁹⁶ diminue de 50 % (figures 55A et B), alors que la phosphorylation du site Tyr¹¹⁷⁵ n'est pas altérée (figures 55A et C).

Ces résultats montrent que le VEGFA induit la phosphorylation du VEGFR2 au moins sur les résidus Tyr⁹⁹⁶ et Tyr¹¹⁷⁵ et que la protéine S inhibe la phosphorylation du résidu Tyr⁹⁹⁶ mais pas du résidu Tyr¹¹⁷⁵.

Des études précédentes ont mis en évidence le rôle des protéines phosphatases SHPs (SHP1 et SHP2) dans la déphosphorylation du VEGFR2.^{319,321,322} Afin de vérifier si l'inhibition de la phosphorylation du VEGFR2 par le VEGFA après prétraitement avec la protéine S impliquait les protéines phosphatases SHPs, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique : le NSC 87877.^{542,543} Les figures 55A et B montrent que le prétraitement avec le NSC87877 reverse l'inhibition de la phosphorylation du résidu Tyr⁹⁹⁶ du VEGFR2

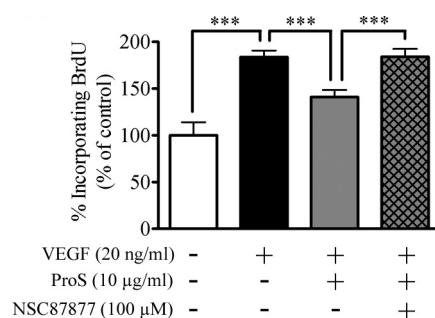


Figure 56 : Les protéines phosphatases SHPs médient l'effet inhibiteur exercé par la protéine S sur la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA

La prolifération des HUVECs a été évaluée par mesure du taux d'incorporation de BrdU après 24 h de traitement en présence ou non de VEGFA (20 ng/ml) additionné ou non de protéine S (ProS) humaine à 10 µg/ml. Les HUVECs ont été préalablement traités pendant 3h avec l'inhibiteur NSC87877 à 100 µM ou avec sa solution de dilution avant la stimulation avec le VEGFA additionné ou non de protéine S. Les données sont exprimées en pourcentage moyen du taux d'incorporation de BrdU du contrôle \pm SD ***p<0,001 (n=3 en triplicats).

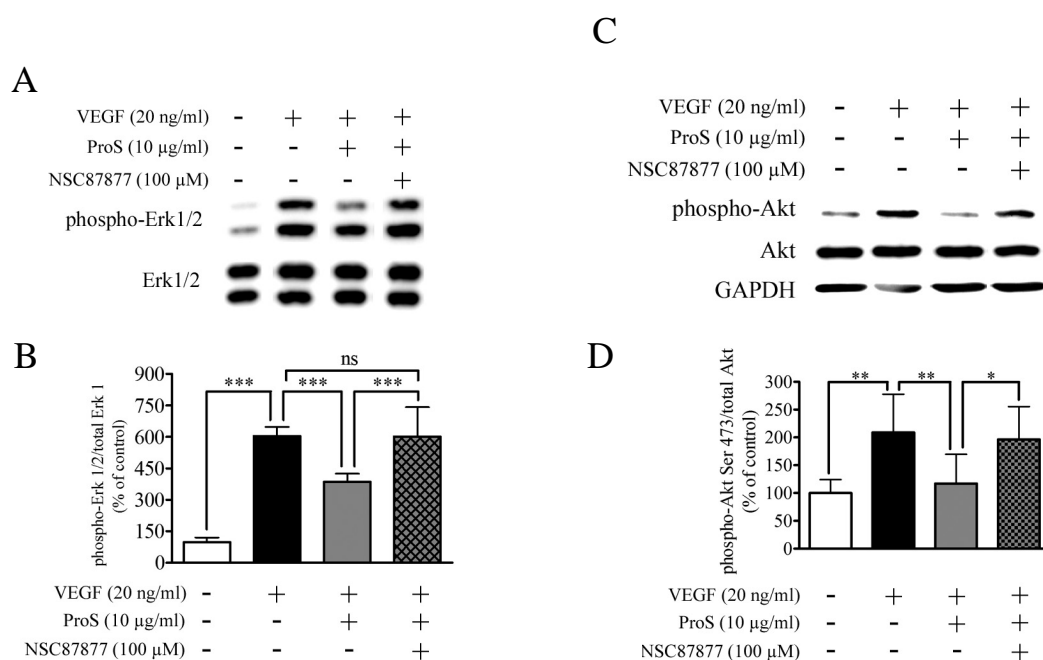


Figure 57 : Les protéines phosphatases SHPs médient l'inhibition des voies de signalisation induite par le VEGFA exercé par la protéine S

Western blot représentatif de la phosphorylation de Erk 1/2 Thr²⁰² et Tyr²⁰⁴ (A) et de Akt Ser⁴⁷³ (C) dans les HUVECs après 15 min de stimulation avec la protéine S (ProS à 10 µg/ml) ou sa solution de dilution, puis 5 min de traitement avec le VEGFA (20 ng/ml). Un Western blot anti-Erk 1/2 ou anti-Akt total a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées. Les HUVECs ont été préalablement carencées en SVF pendant 24 h puis pré-traitées pendant 3h avec l'inhibiteur NSC87877 à 100 µM ou avec sa solution de dilution avant stimulation avec la protéine S puis le VEGFA.

Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines Erk 1/2 phosphorylées (B) ou de protéines Akt phosphorylées (D) rapporté à la quantité de protéines Erk 1/2 ou Akt totale en condition contrôle \pm SD ***p<0,001 ; **p<0,01 ; *p<0,05 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

induite par la protéine S et rétablit un taux de phosphorylation comparable à celui observé lors du traitement avec le VEGFA. Par ailleurs, le prétraitement réalisé avec le NSC 87877 n'a eu aucun effet sur la phosphorylation du site Tyr¹¹⁷⁵ du VEGFR2 après traitement avec la protéine S et le VEGFA (figures 55A et C), démontrant ainsi la spécificité d'action de la protéine S sur la phosphorylation du site Tyr⁹⁹⁶. Des études précédentes ont démontré que la protéine phosphatase SHP1 est capable de déphosphoryler à la fois le résidu Tyr⁹⁹⁶ ainsi que le résidu Tyr¹¹⁷⁵ du VEGFR2.³¹⁹ Par contre, la protéine phosphatase SHP2 n'est capable de déphosphoryler que le résidu Tyr⁹⁹⁶ du VEGFR2.³²¹ Enfin, plus indirectement, une dernière étude a démontré que la protéine Gas6 est capable de déphosphoryler le VEGFR2 via l'activation de la protéine phosphatase SHP2.³²² L'ensemble de ces données suggère que la protéine phosphatase SHP2 joue un rôle important dans l'inhibition de la phosphorylation du VEGFR2.

Ces résultats suggèrent que la protéine phosphatase SHP2 est responsable de la déphosphorylation du VEGFR2 induite par la protéine S.

5 La protéine phosphatase SHP2 médie l'effet anti-angiogénique de la protéine S

5.1 Les protéines phosphatases SHPs sont impliquées dans les effets anti-angiogéniques de la protéine S

Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine S inhibe la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA. Dans les mêmes conditions, en présence de l'inhibiteur des protéines phosphatases SHPs et de la protéine S, le pourcentage d'incorporation de la BrdU est identique à celui observé en présence de VEGFA à 20 ng/ml (figure 56). Les protéines phosphatases SHPs sont donc impliquées dans l'inhibition de la prolifération dépendante du VEGFA exercée par la protéine S. Le traitement avec l'inhibiteur des protéines phosphatases SHPs, en présence de la protéine S a également rétabli le taux de phosphorylation de Erk 1/2 (figures 57A et B) et de Akt (figures 57C et D) au niveau du taux de phosphorylation observé en présence de VEGFA à 20 ng/ml (figure 57). Ces résultats montrent l'implication des protéines phosphatases SHPs dans l'inhibition de l'activation des voies de signalisation dépendante du VEGFA médiée par la protéine S.

La protéine phosphatase SHP2 serait impliquée dans l'effet anti angiogénique exercé par la protéine S.

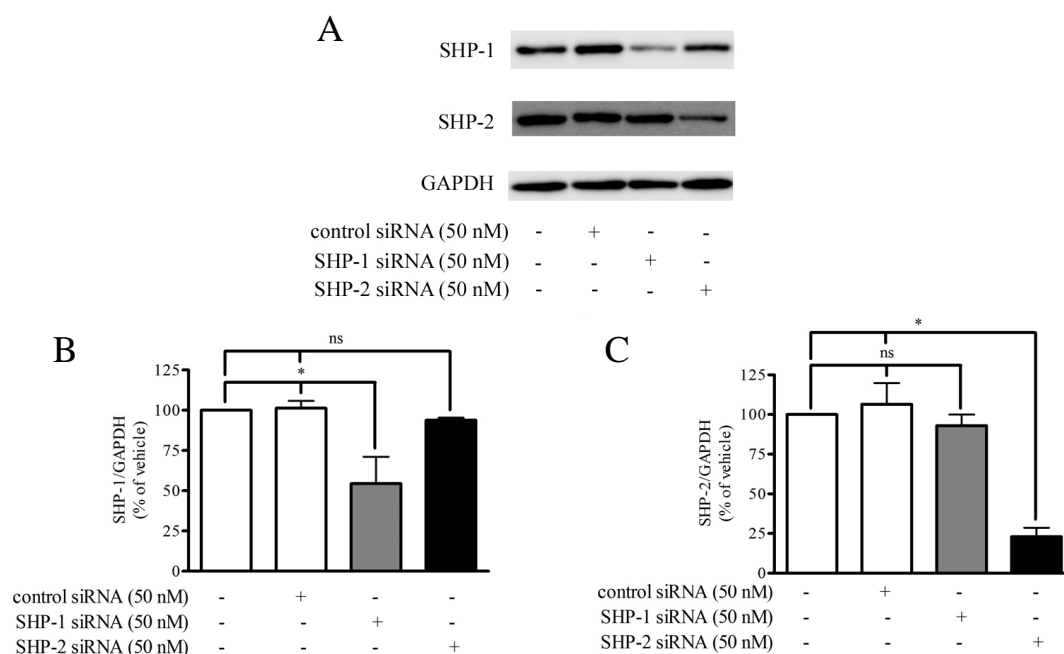


Figure 58 : Expression protéique de SHP1 et 2 après 48 h de transfection par siRNA

(A) Western blot représentatif de l'expression de SHP1 et de SHP2 après 48 h de transfection avec l'agent transfectant (contrôle) ou avec 50 nM de siRNA contrôle ou de siRNA SHP1 ou de siRNA SHP2. Un Western blot anti-GAPDH a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées.

Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines SHP1 (B) ou SHP2 (C) rapporté à la quantité de protéines GAPDH en condition contrôle \pm SD * $p < 0,05$; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

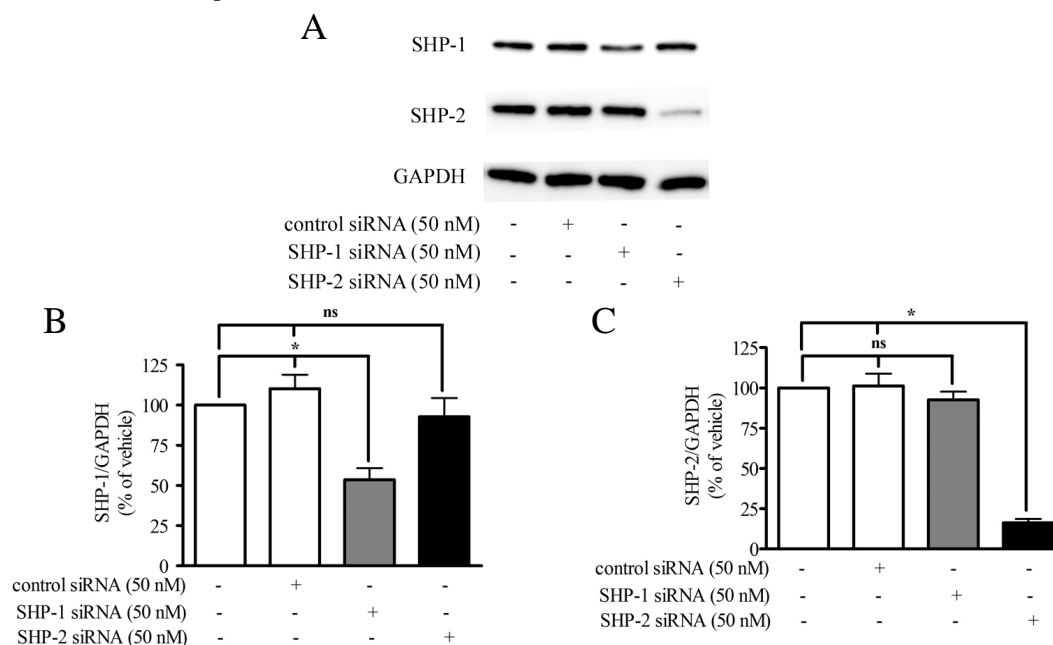


Figure 59 : Expression protéique de SHP1 et 2 après 72 h de transfection par siRNA

(A) Western blot représentatif de l'expression de SHP1 et de SHP2 après 72 h de transfection avec l'agent transfectant (contrôle) ou avec 50 nM de siRNA contrôle ou de siRNA SHP1 ou de siRNA SHP2. Un Western blot anti-GAPDH a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées.

Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines SHP1 (B) ou SHP2 (C) rapporté à la quantité de protéines GAPDH en condition contrôle \pm SD * $p < 0,05$; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

5.2 La protéine phosphatases SHP2 est responsable de l'inhibition de la prolifération induite par la protéine S

5.2.1 Modèle de répression par petits ARN interférents (siRNA)

Afin de démontrer l'implication des protéines phosphatases dans les effets observés, nous avons décidé d'inhiber l'expression de l'une ou l'autre des protéines phosphatases grâce à la méthode d'interférence par petits ARN. Par Western blot, nous montrons qu'après 48 h (figure 58) et 72 h (figure 59) l'expression de SHP1 et de SHP2 est inhibée. La répression observée concernant SHP1 est de 50% (figure 58A) après 48 h de transfection, et reste stable après 72 h de transfection (figure 59A). L'expression de la protéine phosphatase SHP2 est quant à elle diminuée de 75% après 48 h de transfection (figure 58B) et reste stable après 72 h de transfection (figure 59B). Nous avons par ailleurs observé que l'inhibition d'expression de l'une de ces protéines phosphatases à l'aide des petits ARN interférents (small interfering Ribonucleic Acid : siRNA) ne modifie pas l'expression de l'autre protéine phosphatase (figures 58 et 59).

Nous avons validé notre modèle de répression des protéines phosphatases SHPs grâce la méthode d'interférence par petits ARN.

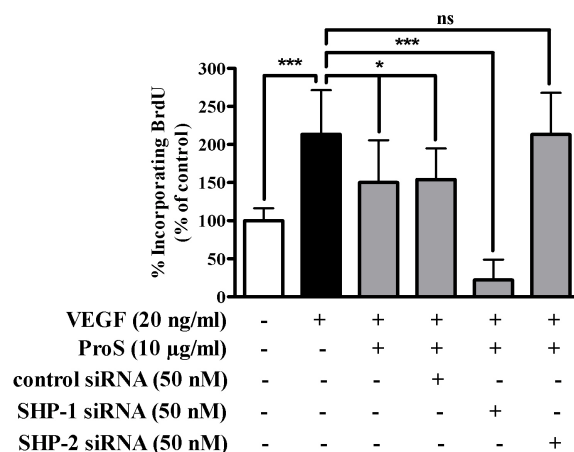


Figure 60 : La protéine phosphatase SHP2 médie l'effet inhibiteur exercé par la protéine S sur la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA

La prolifération des HUVECs a été évaluée par mesure du taux d'incorporation de BrdU après 24 h de traitement en présence ou non de VEGFA (20 ng/ml) additionné ou non de protéine S (ProS) humaine à 10 µg/ml. Les HUVECs ont été préalablement transfectées pendant 48 h avec l'agent transfectant (contrôle) ou avec 50 nM de siRNA contrôle ou de siRNA SHP1 ou de siRNA SHP2 avant stimulation avec le VEGFA additionné ou non de protéine S. Les données sont exprimées en pourcentage moyen du taux d'incorporation de BrdU du contrôle \pm SD ***p<0,001 ; *p<0,05 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

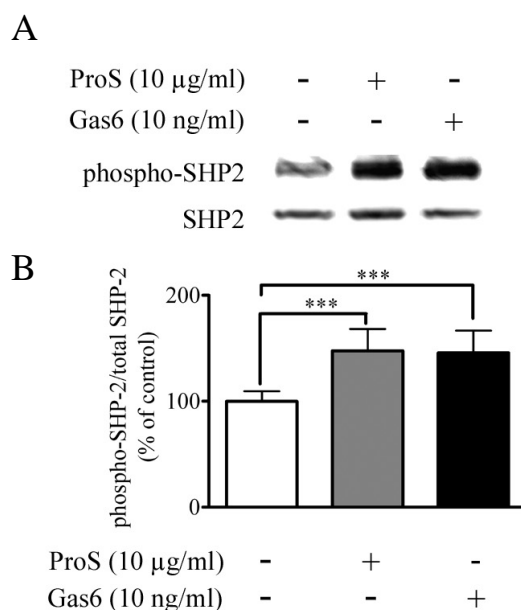


Figure 61 : La protéine S active la protéine phosphatase SHP2

(A) Western blot représentatif de la phosphorylation de la protéine phosphatase SHP2 Tyr⁵⁴² dans les HUVECs. Les HUVECs préalablement carencées en SVF pendant 24 h ont été stimulées pendant 15 min avec la protéine S (10 µg/ml) ou la protéine Gas6 (10 ng/ml) ou avec leur solution de dilution. Un Western blot anti-SHP2 a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées.

(B) Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines SHP2 phosphorylées rapporté à la quantité de protéines SHP2 totale en condition contrôle \pm SD ***p<0,001 (n=3 en triplicats).

5.2.2 La protéine phosphatase SHP2 médie l'effet anti-prolifératif induit par la protéine S

Une fois les siRNA validés, nous les avons utilisés dans nos expériences de prolifération. Dans toutes les conditions, l'agent transfectant était présent dans le milieu de façon à normaliser les résultats. La figure 60 montre que dans ces conditions, la prolifération induite par le VEGFA est inhibée par la protéine S. Cette inhibition n'a pas été altérée par l'ajout des siRNA contrôles. La transfection avec le siRNA dirigé contre les ARNm de la protéine phosphatase SHP1 n'a pas permis de réverser l'effet inhibiteur induit par la protéine S. En revanche, la transfection avec le siRNA dirigé contre les ARNm de la protéine phosphatase SHP2 a réversé cette inhibition (figure 60). Ces résultats montrent que la protéine phosphatase SHP2 est impliquée dans l'inhibition de la prolifération dépendante du VEGFA induite par la protéine S. La transfection avec le siRNA dirigé contre les ARNm de la protéine phosphatase SHP1 a fortement diminué la prolifération des cellules endothéliales, en dessous du taux de prolifération endogène (figure 60). Ce résultat indique que la protéine phosphatase SHP1 est essentielle à la prolifération endogène des cellules endothéliales.

La protéine phosphatase SHP2 est responsable de l'inhibition des la prolifération dépendante du VEGFA induite par la protéine S.

5.3 Activation de la protéine phosphatase SHP2 par la protéine S

Enfin, nous avons recherché si la protéine S activait directement la protéine phosphatase SHP2 dans les cellules endothéliales. La protéine Gas6 a été utilisée comme contrôle positif de la phosphorylation de la protéine phosphatase SHP2 comme cela a été précédemment décrit.³²² Comme le montre les figures 61A et B, le traitement avec la protéine S a augmenté de manière significative le taux de phosphorylation de la protéine phosphatase SHP2 de 50%.

La protéine phosphatase SHP2 activée par la protéine S médie son effet anti-angiogénique.

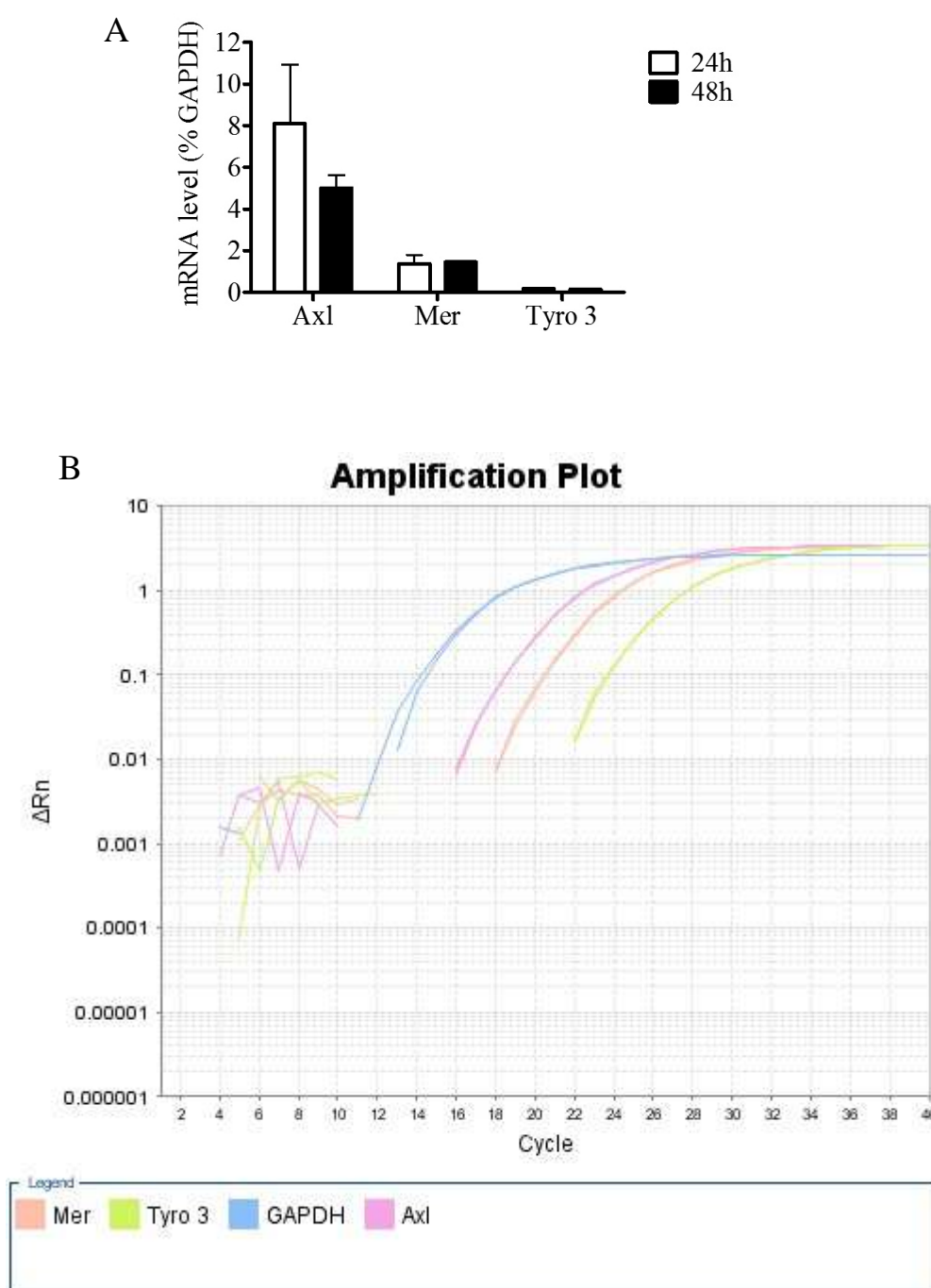


Figure 62 : Expression des ARNm des récepteurs TAM dans les cellules endothéliales

(A) Expression des ARNm des récepteurs TAM dans les HUVECs mesurée par qPCR. Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité d'ARNm de Tyro3, Axl ou Mer rapporté à la quantité d'ARNm de la GAPDH \pm (n=3 en triplicats).

(B) Exemple de courbes d'amplification obtenues par qPCR pour l'expression des ARNm de la GAPDH (bleu), d'Axl (rose), de Mer (orange) et de Tyro3 (vert).

6 Rôle des récepteurs TAM dans l'effet anti-angiogénique de la protéine S

La protéine S est un ligand pour les récepteurs à activité tyrosine kinase TAM (Tyro3, Axl et Mer).⁴³⁵ Nous avons d'abord voulu déterminer si un ou plusieurs récepteurs TAM étaient impliqués dans les effets cellulaires de la protéine S. Le taux d'expression des récepteurs TAM étant différents selon la nature des cellules endothéliales considérée (HUVECs⁵²⁸ ou cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique⁴⁴⁰), nous avons tout d'abord étudié le taux d'expression de chacun des récepteurs TAM dans notre modèle cellulaire.

6.1 Expression des récepteurs TAM dans les cellules endothéliales

Une fois les amorces validées, nous avons évalué par RT-qPCR l'expression relative des ARNm de chacun des récepteurs TAM par rapport à l'expression des ARNm de la GAPDH dans les cellules endothéliales, après 24 h et 48 h de culture. La figure 62A montre que parmi les 3 récepteurs TAM de la protéine S, le récepteur Axl est le plus exprimé (8% des ARNm de la GAPDH après 24 h de culture). Les ARNm du récepteur Mer sont quant à eux 3 fois moins exprimés que ceux de Axl et ceci quel que soit le temps de culture. Enfin le récepteur Tyro3 est très faiblement exprimé par les cellules endothéliales, le taux d'expression de ses ARNm étant 11 fois inférieur à celui des ARNm du récepteur Mer et 33 fois inférieur à celui des ARNm du récepteur Axl (figures 62A et B). Ces résultats sont en accord avec une étude précédente qui montre une distribution similaire de l'expression des récepteurs TAM dans les HUVECs.⁵²⁸

Dans notre modèle cellulaire le récepteur TAM le plus abondant est le récepteur Axl, le récepteur Mer est moins exprimé que le récepteur Axl et le récepteur Tyro3 est très faiblement exprimé.

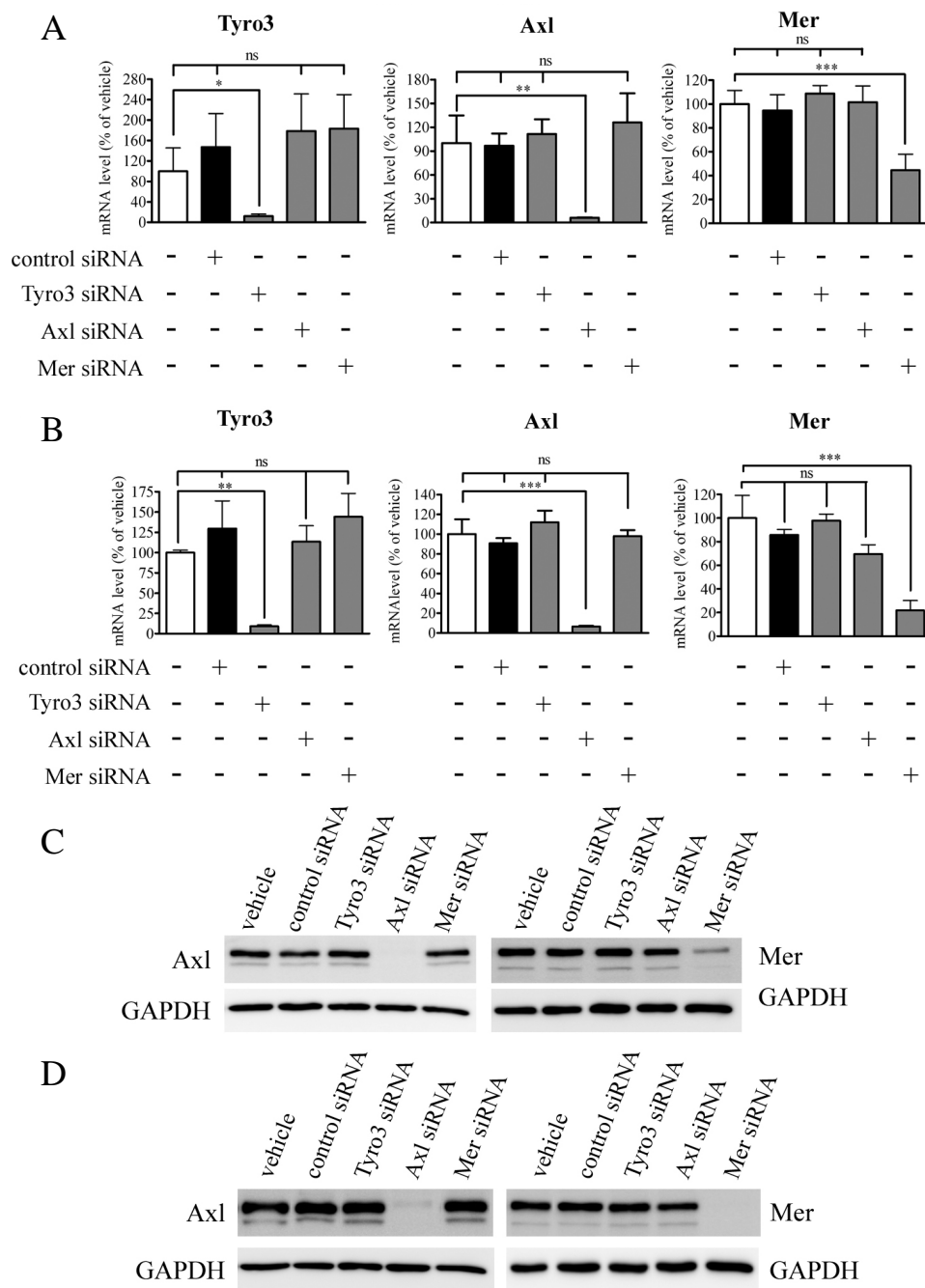


Figure 63 : Validation des siRNA dirigés contre les ARNm des récepteurs TAM après 24 h et 48 h de transfection

Expression des ARNm des récepteurs TAM dans les HUVECs mesurée par qPCR après 24 h (**A**) ou 48 h (**B**) de transfection avec l'agent transfectant (contrôle) ou 50 nM de siRNA contrôle ou 5 nM de siRNA Tyro3 ou 5 nM de siRNA Axl ou 50 nM de siRNA Mer. Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité d'ARNm de Tyro3, Axl ou Mer rapporté à la quantité d'ARNm de la GAPDH en condition contrôle \pm SD *** p <0,001 ; ** p <0,01 ; * p <0,05 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

Expression protéique du récepteur Axl, du récepteur Mer analysée par Western blot après 24 h (**C**) ou 48 h (**D**) de transfection avec l'agent transfectant (vehicle) ou 50 nM de siRNA contrôle, ou 5 nM de siRNA Tyro3, ou 5 nM de siRNA Axl, ou 50 nM de siRNA Mer (n=1). Un Western blot anti-GAPDH a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées.

6.2 Validation du modèle de répression des récepteurs TAM par siRNA

Après avoir montré que les HUVECs expriment les trois récepteurs TAM dans nos conditions expérimentales, nous avons réalisé une expérience de mise au point de la répression de leur expression par petits ARN interférents.

Dans toutes les conditions, l'agent transfectant était présent dans le milieu de façon à normaliser les résultats. Les figures 63A et B montrent respectivement à 24 h et à 48 h que les siRNA dirigés contre les ARNm des récepteurs Tyro3, Axl et Mer ont bien inhibé significativement l'expression des ARNm de leurs cibles alors que le siRNA contrôle n'a eu aucun effet significatif. Nous avons observé par ailleurs que l'inhibition de l'expression de l'un des trois récepteurs TAM ne modifiait pas l'expression des deux autres (aucun effet de compensation).

Ces résultats ont été confirmés par Western blot pour les récepteurs Axl et Mer (figures 63C et D). Le signal obtenu pour chacun des récepteurs (Axl et Mer) se présente sous la forme d'un doublet (figures 63C et D), qui pourrait correspondre à des niveaux de glycosylation différents pour ces récepteurs, comme cela a déjà été décrit par d'autres équipes.^{455,460,461,470} Nous n'avons pas été en mesure de détecter l'expression du récepteur Tyro3 par Western blot. Ceci pourrait être expliqué par son faible taux d'expression de sa forme protéique à la surface des cellules endothéliales, en accord avec le faible taux d'expression de son ARNm.

L'ensemble de ces résultats montre l'efficacité et la spécificité des siRNA dirigés contre les ARNm de tous les récepteurs TAM.

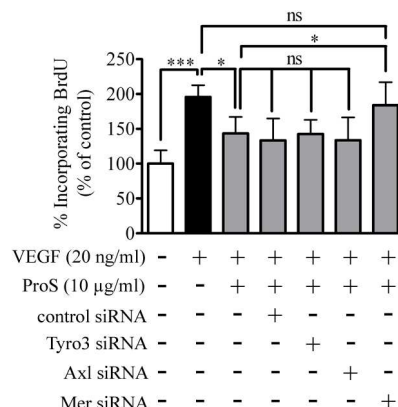


Figure 64 : Le récepteur Mer médie l'effet inhibiteur exercé par la protéine S sur la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA

La prolifération des HUVECs a été évaluée par mesure du taux d'incorporation de BrdU après 24 h de traitement en présence ou non de VEGFA (20 ng/ml) additionné ou non de protéine S (ProS) humaine à 10 µg/ml. Les HUVECs ont été préalablement transfectées pendant 24 h avec l'agent transfectant (contrôle) ou 50 nM de siRNA contrôle ou 5 nM de siRNA Tyro3 ou 5 nM de siRNA Axl ou 50 nM de siRNA Mer avant stimulation avec le VEGFA additionné ou non de protéine S. Les données sont exprimées en pourcentage moyen du taux d'incorporation de BrdU du contrôle \pm SD *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

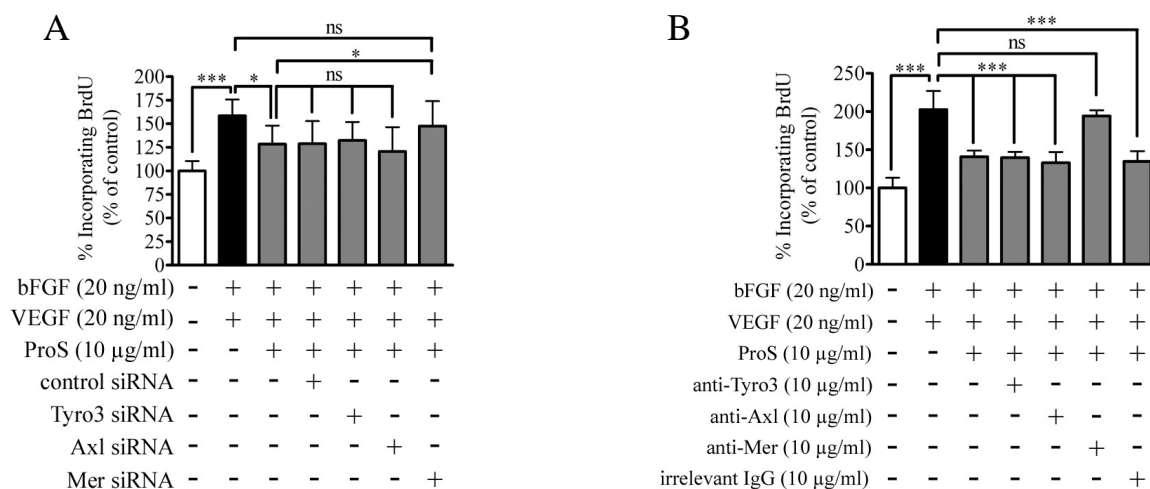


Figure 65 : Le récepteur Mer médie l'effet inhibiteur exercé par la protéine S sur la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA et le FGF2

(A) La prolifération des HUVECs a été évaluée par mesure du taux d'incorporation de BrdU après 24 h de traitement en présence ou non de VEGFA et de FGF2 (bFGF) (20 ng/ml) additionné ou non de protéine S (ProS) humaine à 10 µg/ml. Les HUVECs ont été préalablement transfectées pendant 24 h avec l'agent transfectant (contrôle) ou 50 nM de siRNA contrôle ou 5 nM de siRNA Tyro3 ou 5 nM de siRNA Axl ou 50 nM de siRNA Mer avant stimulation avec le VEGFA et le FGF2 additionné ou non de protéine S. Les données sont exprimées en pourcentage moyen du taux d'incorporation de BrdU du contrôle \pm SD *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

(B) La prolifération des HUVECs a été évaluée par mesure du taux d'incorporation de BrdU après 24 h de traitement en présence ou non de VEGFA et de FGF2 (20 ng/ml) additionné ou non de protéine S (ProS) humaine à 10 µg/ml. Les HUVECs ont été préalablement traitées avec des anticorps dirigés contre la partie extracellulaire des récepteurs TAM (R&D Sysytems) ou d'IgG contrôles provenant de la même espèce (Santa Cruz) à 10 µg/ml, 1 h avant de réaliser les autres traitements. Les données sont exprimées en pourcentage moyen du taux d'incorporation de BrdU du contrôle \pm SD *** $p < 0,001$; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

6.3 Le récepteur Mer médie l'effet anti-prolifératif induit par la protéine S

Suite à la validation des siRNA dirigés contre les ARNm des récepteurs TAM dans les cellules endothéliales, nous nous sommes intéressés à identifier le ou les récepteur(s) impliqué(s) dans l'effet antiprolifératif induit par la protéine S sur la prolifération des cellules endothéliales dépendante du VEGFA.

Comme le montre la figure 64, seul l'inhibition de l'expression du récepteur Mer par siRNA a permis de réverser significativement l'effet anti-prolifératif de la protéine S suggérant que le récepteur Mer est responsable des effets cellulaires anti-angiogéniques.

Lorsque la prolifération est cette fois-ci stimulée à la fois par le VEGFA et le FGF2, en présence des siRNA (figure 65A) ou des anticorps bloquants (figure 65B) dirigés contre le domaine extracellulaire des récepteurs à activité tyrosine kinase TAM, seul les siRNA dirigés contre les ARNm du récepteur Mer ou les anticorps « anti-Mer » réversent l'effet anti-prolifératif induit par la protéine S par rapport au siRNA contrôle ou aux IgG contrôles.

Ces résultats montrent que le récepteur Mer est le récepteur TAM impliqué dans l'effet anti-prolifératif induit par la protéine S sur les cellules endothéliales.

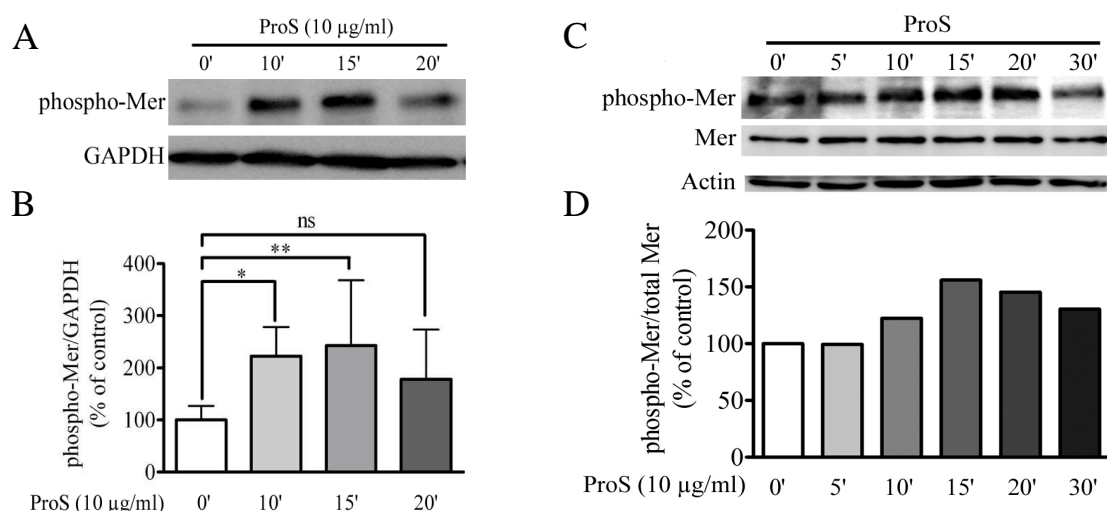


Figure 66 : La protéine S active le récepteur Mer humain et Mer murin

(A) Western blot représentatif de la phosphorylation du récepteur tyrosine kinase Mer obtenu dans les HUVECs après 0 (contrôle), 10, 15 ou 20 min de stimulation avec la protéine S (ProS à 10 µg/ml). Un Western blot anti-GAPDH a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées.

(B) Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines Mer phosphorylées rapporté à la quantité de protéines GAPDH en condition contrôle \pm SD **p<0,01 ; *p<0,05 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

(C) Western blot représentatif de la phosphorylation du récepteur tyrosine kinase Mer obtenu dans les cellules murines TM4 après 0 (contrôle), 5, 10, 15, 20 ou 30 min de stimulation avec la protéine S (ProS) humaine (10 µg/ml). Les Western blot anti-Mer total et anti-Actine ont été réalisés comme contrôle de la quantité de protéines déposées.

(D) Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines Mer phosphorylées rapporté à la quantité de protéines Mer totales en condition contrôle (n=1).

6.4 La protéine S active le récepteur Mer

Etant donné que, d'une part, les expériences *in vivo* (bouchon de Matrigel) ont été réalisées chez la souris en utilisant de la protéine S humaine, que les expériences *in vitro* ont été menées sur des cellules endothéliales humaines (HUVECs) et que d'autre part, l'activation des récepteurs TAM semble dépendante de l'espèce considérée ;^{424,435} nous avons étudié par Western blot l'activation du récepteur Mer humain et murin par la protéine S humaine. Les modèles cellulaires choisis sont respectivement les HUVECs et une lignée de cellules de Sertoli murines (TM4) connue pour exprimer les trois récepteurs TAM.⁵³¹ Les figures 66A et C montrent clairement l'activation du récepteur Mer par la protéine S avec une cinétique caractéristique d'un récepteur à activité tyrosine kinase dans les deux types cellulaires (figures 66B et D). Suite à cette première phase d'activation, une deuxième phase de désactivation progressive au cours du temps est observée dans les deux types cellulaires (figure 66B). Il est intéressant de noter que le temps d'activation maximale du récepteur Mer (après 15 min de stimulation) correspond exactement au temps de prétraitement avec la protéine S, pour lequel des interférences avec les voies de signalisation du VEGFA ont été préalablement observées au cours de notre étude.

Nous avons démontré que la protéine S humaine active le récepteur Mer humain et murin.

7. Le récepteur Mer est essentiel pour le recrutement de la phosphatase SHP2 induite par la protéine S

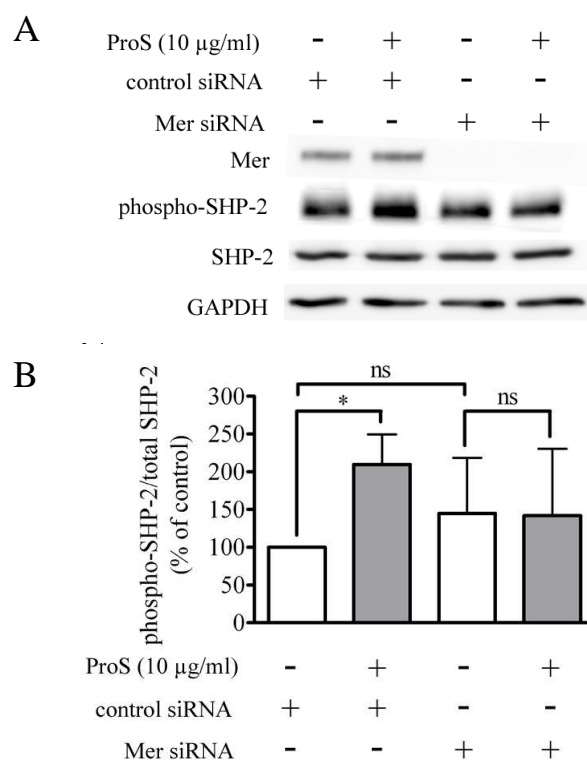


Figure 67 : Le récepteur Mer est essentiel pour l'activation de la protéine phosphatase SHP2 induite par la protéine S

(A) Western blot représentatif de la phosphorylation de la protéine phosphatase SHP2 dans les HUVECs après 15 min de stimulation avec la protéine S (ProS à 10 µg/ml). Les HUVECs, carencées en SVF pendant 24 h, ont été préalablement transfectées pendant 48 h avec 50 nM de siRNA contrôle ou 50 nM de siRNA Mer. Un Western blot anti-Mer a été réalisé afin de s'assurer de la répression du récepteur tyrosine kinase Mer au moment de la stimulation par la protéine S. Les Western blot anti-SHP2 et anti-GAPDH ont été réalisés comme contrôle de la quantité de protéines déposées.

(B) Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines SHP2 phosphorylées rapporté à la quantité de protéines SHP2 totale en condition contrôle \pm SD * $p < 0,05$; ns : non significatif (n=3 en duplicats).

7 Le récepteur Mer est essentiel pour le recrutement de la phosphatase SHP2 induite par la protéine S

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'implication du récepteur Mer lors de l'activation de la protéine phosphatase SHP2 induite par la protéine S. Le Western blot anti-Mer montre que l'inhibition de l'expression de Mer a été totale après transfection avec le siRNA Mer (figure 67A). En présence de siRNA contrôles, la protéine phosphatase SHP2 reste activée par la protéine S. Lorsque l'expression du récepteur Mer est inhibée, il n'y a pas de modification du taux d'activation basal de la protéine phosphatase SHP2. Par contre, l'inhibition de l'expression du récepteur Mer a supprimée l'activation de la protéine phosphatase SHP2 induite par la protéine S (figures 67A et B). Ces données confirment l'implication du récepteur Mer au cours de l'activation de la protéine phosphatase SHP2 nécessaire à la déphosphorylation du VEGFR2 induite par la protéine S et donc à son effet anti-angiogénique.

Ces résultats montrent que le récepteur Mer est essentiel pour le recrutement de la protéine phosphatase SHP2 induit par la protéine S.

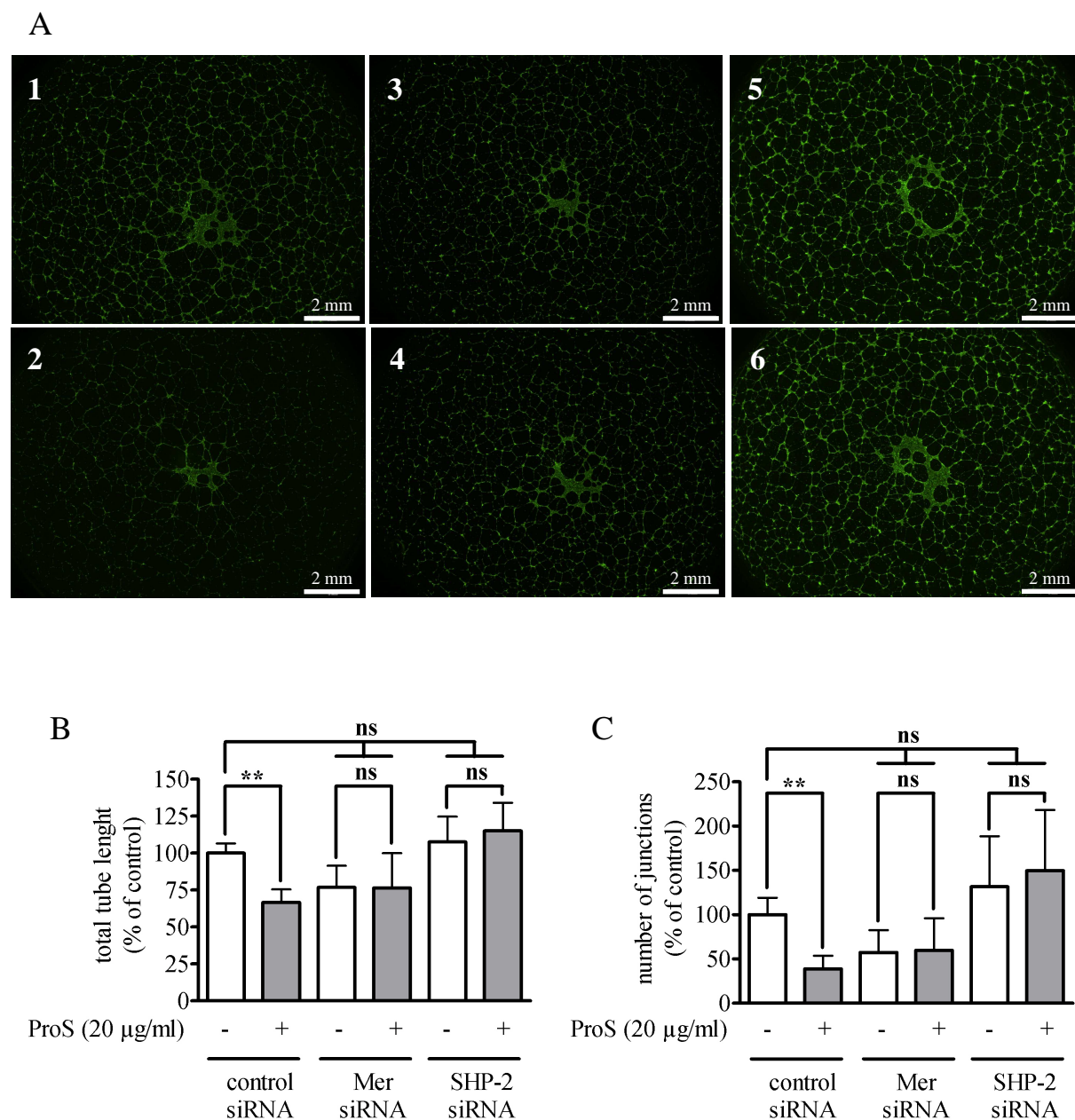


Figure 68 : Le récepteur Mer et la protéine phosphatase SHP2 médient l'effet anti-angiogénique de la protéine S *in vitro*

A) Photographies représentatives du réseau formé par les HUVECs sur Matrigel après transfection avec 5 nM de siRNA contrôle (1), ou Mer (3), ou SHP2 (5) seul, ou 5 nM de siRNA contrôle (2), ou Mer (4), ou SHP2 (6) supplémenté avec la protéine S (ProS) à 20 µg/ml (n=3 en duplicats). Les HUVECs ont été incubées avec 25 µM de calcéine AM (Interchim) avant d'être fixées afin de mieux observer le réseau capillaire. Les photographies du réseau ont été réalisées grâce au microscope MVX10 (Olympus), barre d'échelle : 2 mm.

Quantification de la longueur totale (**B**) et du nombre total de jonctions (**C**) du réseau formé par les HUVECs grâce au logiciel Angioquant comme décrit précédemment.⁵³⁵ Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la longueur totale, ou du nombre total de jonctions du réseau par rapport au siRNA contrôle non stimulé ± SD **p<0,01 ; ns : non significatif (n=3 en duplicats).

8 Le récepteur Mer et la protéine phosphatase SHP2 sont responsables de l'effet anti-angiogénique de la protéine S

Après avoir testé l'implication des récepteurs TAM dans l'effet anti-prolifératif de la protéine S, nous avons évalué le rôle de ces récepteurs dans l'effet anti-angiogénique de la protéine S observé *in vitro*.

La réalisation de ce test a nécessité une nouvelle validation de l'efficacité des siRNA dirigés contre les ARNm du récepteur Mer et de la protéine phosphatase SHP2.

A 24 h et à 48 h les siRNA dirigés contre les ARNm du récepteur Mer ont totalement inhibé l'expression de sa protéine cible (annexe 1). Les siRNA dirigés contre les ARNm de SHP2 ont diminué leur expression de 75% alors que les siRNA contrôles n'ont eu aucun effet significatif (annexe 2).

Une fois l'efficacité des siRNA validée, nous les avons utilisés lors du test *in vitro* de formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales. La figure 68A image 1 montre le réseau capillaire obtenu dans ces conditions après transfection avec le siRNA contrôle. En présence de siRNA contrôle, la protéine S inhibe de 35% de 60% respectivement la longueur totale du réseau (figures 68A image 2 et B) et le nombre de jonctions totales du réseau capillaire (figures 68A image 2 et C). Dans les conditions de base, la transfection avec les siRNA dirigés contre les ARNm du récepteur Mer (figure 68A image 3, B et C) ou de la protéine phosphatase SHP2 (figure 68A image 5, B et C) n'a pas influencé significativement la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales. En présence de protéine S, la transfection avec les siRNA dirigés contre les ARNm du récepteur Mer (figures 68A image 4, B et C) ou de la protéine phosphatase SHP2 (figures 68A image 6, B et C) a permis de réverser l'inhibition de la formation du réseau vasculaire dépendante de la protéine S.

Ces résultats montrent que le récepteur Mer et la protéine phosphatase SHP2 sont impliqués dans l'effet anti-angiogénique exercé par la protéine S.

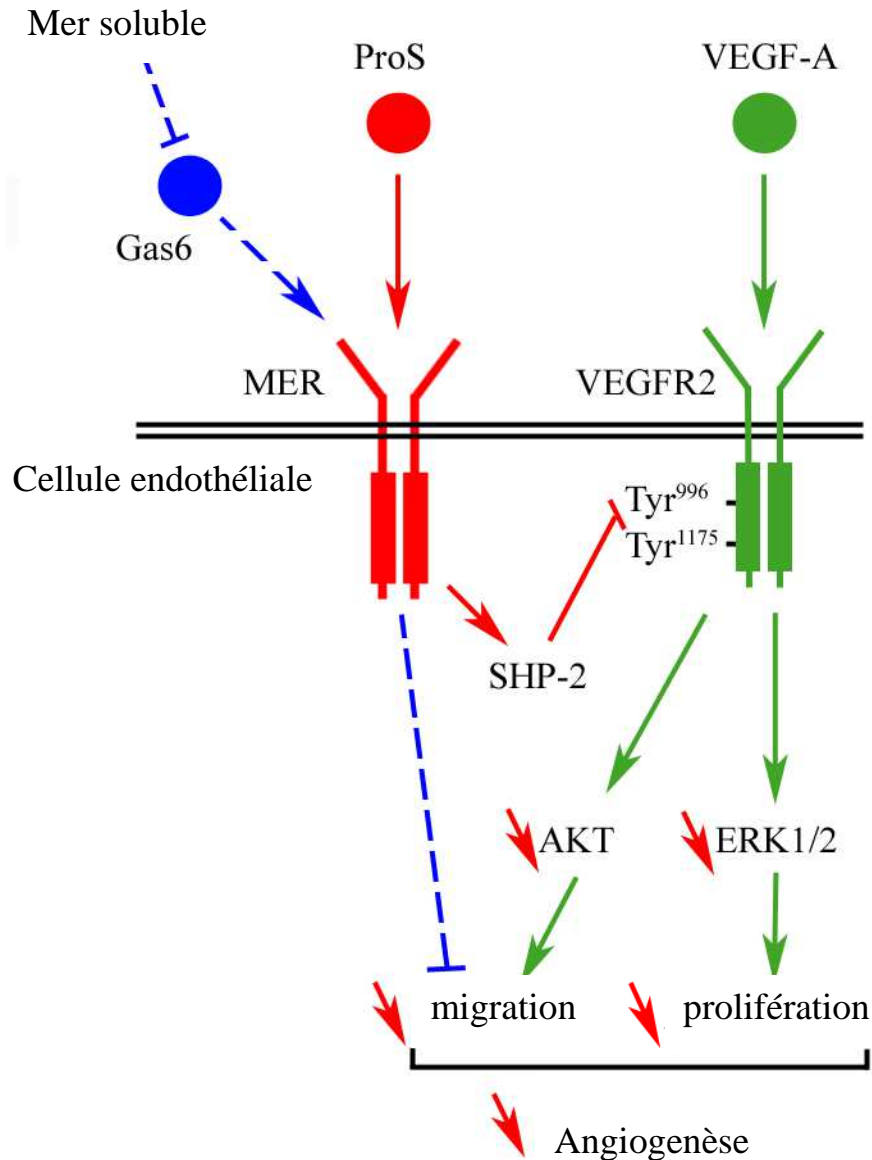


Figure 69 : La protéine S, un inhibiteur endogène de l'angiogenèse

Schéma récapitulatif représentant les interférences entre la protéine S avec la voie de signalisation du VEGFR2 activées par le VEGFA.

En Vert : signalisation intracellulaire du VEGFR2 induite par le VEGFA.

En rouge : modèle de signalisation induite par la protéine S interférant avec la signalisation du VEGFA.

En bleu : voie de signalisation induite par le couple Gas6/Mer.⁵²⁵

9 Conclusion : la protéine S est un inhibiteur endogène de l'angiogenèse

Le VEGFA active son récepteur VEGFR2 en induisant notamment sa phosphorylation sur les tyrosines 996 et 1175, activant ensuite les voies de signalisation de la PI3K/Akt et des MAP-Kinases Erk 1/2, associées respectivement à la migration et à la prolifération des cellules endothéliales, conduisant à la formation du réseau capillaire (figure 69 en vert).

La protéine S active son récepteur tyrosine kinase Mer et recrute la protéine phosphatase SHP2, qui déphosphoryle à son tour le VEGFR2 sur la tyrosine 996, diminuant par la suite l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt et des MAP-Kinases Erk 1/2, puis la migration et la prolifération consécutives des cellules endothéliales à l'origine de la formation du réseau capillaire (figure 69 en rouge).

Pendant que nos travaux étaient en cours, une étude récente publiée dans Nature a décrit un phénomène similaire à celui que nous proposons concernant la protéine S⁵²⁵ qui mettrait en jeu l'homologue structural de la protéine S, la protéine Gas6 qui, via l'activation du récepteur tyrosine kinase Mer, inhibe la migration des cellules endothéliales induite par les cellules tumorales. Le récepteur Mer soluble, issu du clivage de la partie extra-cellulaire du récepteur tyrosine kinase Mer à la surface des cellules tumorales,⁴⁶² se fixe sur la protéine Gas6, la neutralisant et supprimant ainsi à la fois sa capacité à activer le récepteur tyrosine kinase Mer et l'inhibition de la migration des cellules endothéliales qui en découle (figure 69 en bleu).

Nos résultats mettent en évidence pour la première fois l'existence d'un axe anti-angiogénique formé par ProS/Mer/SHP2.

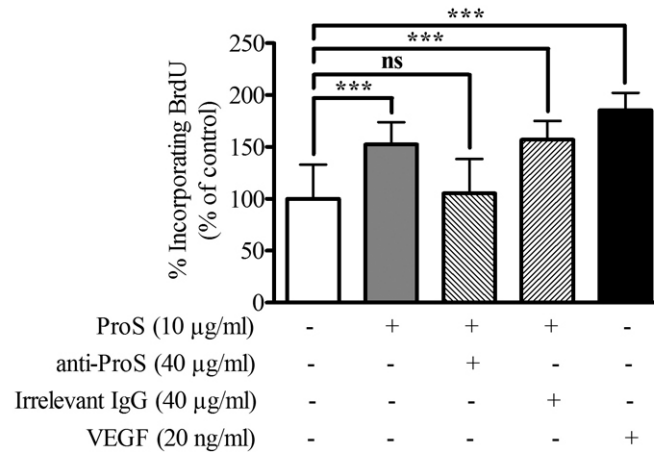


Figure 70 : La protéine S induit directement la prolifération des cellules endothéliales

La prolifération des HUVECs a été évaluée par mesure du taux d'incorporation de BrdU après 24 h de traitement en présence ou non de protéine S (ProS) humaine à 10 µg/ml. La protéine S a été préalablement neutralisée grâce à l'utilisation des anticorps anti-protéine S (Dako) ou d'IgG contrôles provenant de la même espèce que l'anticorps anti-protéine S, 1 h avant de réaliser le traitement. Enfin un traitement avec du VEGFA à 20 ng/ml a été réalisé afin de servir de contrôle positif de référence. Les données sont exprimées en pourcentage moyen du taux d'incorporation de BrdU du contrôle \pm SD *** $p < 0,001$; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

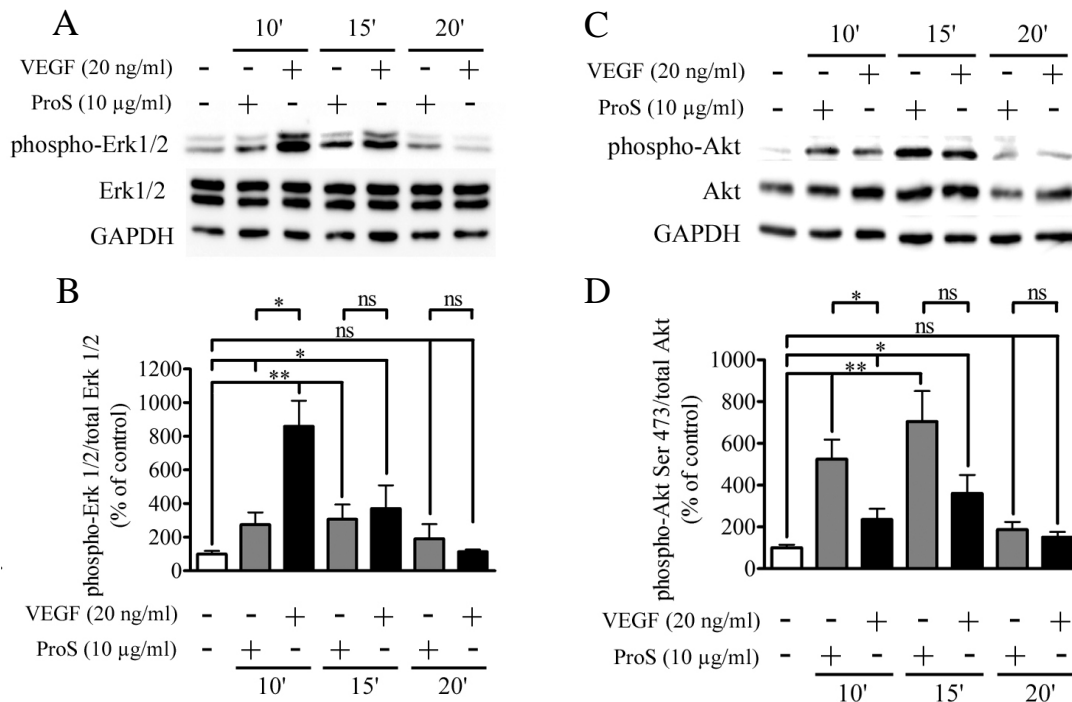


Figure 71 : La protéine S active les voies de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2 et de la PI3K

Western blot représentatif de la phosphorylation de Erk 1/2 Thr²⁰² et Tyr²⁰⁴ (A) et de Akt Ser⁴⁷³ (C) dans les HUVECs après 0, 10, 15 ou 20 min de stimulation avec la protéine S (ProS à 10 µg/ml) ou avec le VEGFA (20 ng/ml). Le traitement avec du VEGFA à 20 ng/ml a été réalisé afin de servir de contrôles positif de référence. Les Western blots anti-Erk 1/2, anti-Akt total et anti-GAPDH ont été réalisés comme contrôle de la quantité de protéines déposées. Les HUVECs ont été préalablement carencées en SVF pendant 24 h. Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines Erk 1/2 phosphorylées (B) ou de protéines Akt phosphorylées (D) rapporté à la quantité de protéines Erk 1/2 ou Akt totales en condition contrôle \pm SD *** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns : non significatif (n=3 en duplicats).

Chapitre 2 : Rôle direct de la protéine S sur les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales exprimant les récepteurs TAM et produisant la protéine S, nous nous sommes intéressés au rôle direct joué par la protéine S sur celles-ci.

1 La protéine S induit la prolifération des cellules endothéliales et active la voie des MAP-Kinases Erk 1/2

1.1 La protéine S active la prolifération des cellules endothéliales

Nous avons tout d'abord testé l'effet de la protéine S sur la prolifération des cellules endothéliales. Après 24 h de traitement avec la protéine S à 10 µg/ml, la prolifération des cellules endothéliales a augmenté de 50% (figure 70). Cet effet est totalement réversé en présence d'anticorps dirigés contre la protéine S mais pas en présence d'IgG contrôles (figure 70). Cette stimulation de la prolifération des cellules endothéliales par la protéine S est donc spécifique à celle-ci. L'effet mitogène induit par la protéine S (augmentation de 50% du taux d'incorporation de la BrdU) est moins important que celui observé en présence d'un facteur de croissance connu pour induire la prolifération des cellules endothéliales, le VEGFA, pour lequel la prolifération des cellules endothéliales a doublé (augmentation de 85% du taux d'incorporation de la BrdU) (figure 70). Ces données montrent que la protéine S agit en tant que mitogène faible pour les cellules endothéliales.

1.2 Voies de signalisation activées par la protéine S

Parallèlement aux expériences de prolifération, nous avons étudié l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 par la protéine S. Nous observons ainsi que la protéine S induit la phosphorylation de Erk 1/2 sur les résidus Thr²⁰² et Tyr²⁰⁴ (figures 71A et B) et de Akt sur le résidu Ser⁴⁷³ au cours du temps (figures 71C et D). La cinétique de phosphorylation de ces protéines est rapide, et présente un taux de phosphorylation maximal après 15 min de stimulation (augmentation de 3,5 fois pour Erk 1/2 et 7 fois pour Akt) diminuant après 20 min de stimulation. La cinétique et l'intensité de la phosphorylation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induites par la protéine S sont différentes de celles induites par le VEGFA (figures 71A et B). Cette différence pourrait expliquer le taux de prolifération plus important précédemment observé en présence de VEGFA. Les figures 71C et D montrent que la protéine S induit la phosphorylation de Akt selon la même cinétique que le VEGFA mais de manière beaucoup plus intense (augmentation de 8 fois après 15 min de stimulation pour la protéine S et de 4 fois pour le VEGFA).

1. La protéine S induit la prolifération cellulaire et active la voie des MAP-Kinases Erk 1/2

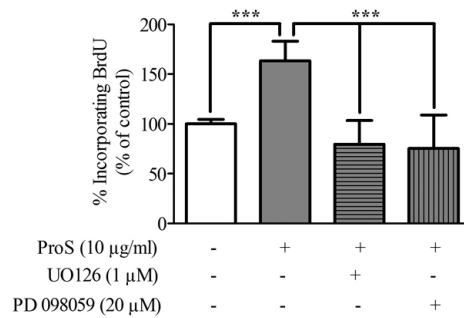


Figure 72 : La voie de MAP-Kinase Erk 1/2 médie l'effet prolifératif induit par la protéine S sur les cellules endothéliales

La prolifération des HUVECs a été évaluée par mesure du taux d'incorporation de BrdU après 24 h de traitement en présence ou non de protéine S (ProS) humaine à 10 µg/ml. Les HUVECs ont été pré-traitées pendant 1 h avec 1 µM de UO126 ou 20 µM de PD098059 ou leur solution de dilution (DMSO) avant de réaliser le traitement avec la protéine S. Les données sont exprimées en pourcentage moyen du taux d'incorporation de BrdU du contrôle \pm SD ***p<0,001 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

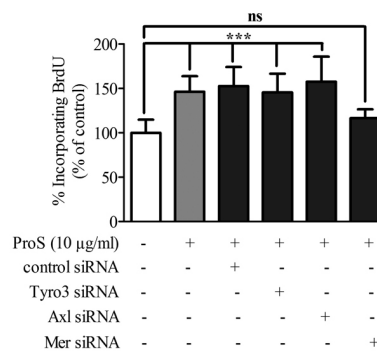


Figure 73 : Le récepteur Mer médie l'effet prolifératif exercé par la protéine S

La prolifération des HUVECs a été évaluée par mesure du taux d'incorporation de BrdU après 24 h de traitement en présence ou non de protéine S (ProS) à 10 µg/ml. Les HUVECs ont été préalablement transfectées pendant 24 h avec l'agent transfectant (contrôle) ou 50 nM de siRNA contrôle, ou 5 nM de siRNA Tyro3, ou 5 nM de siRNA Axl, ou 50 nM de siRNA Mer avant la stimulation. Les données sont exprimées en pourcentage moyen du taux d'incorporation de BrdU du contrôle \pm SD ***p<0,001 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

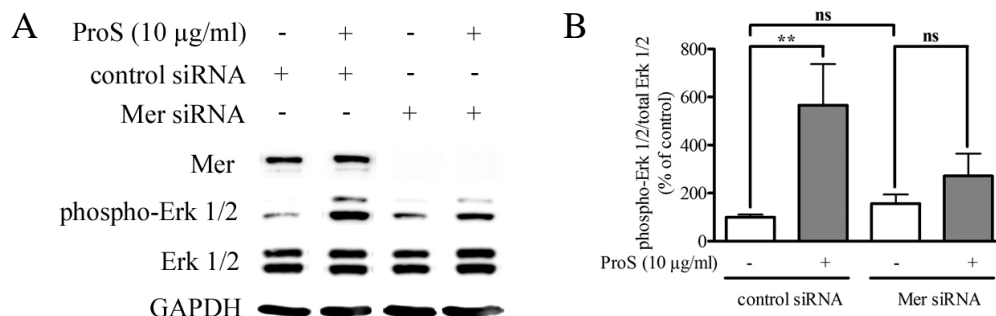


Figure 74 : La protéine S active la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 via le récepteur Mer

(A) Western blot représentatif de la phosphorylation de Erk 1/2 Thr²⁰² et Tyr²⁰⁴ dans les HUVECs après 15 min de stimulation avec la protéine S (ProS à 10 µg/ml). La répression de l'expression du récepteur Mer a été suivie par Western blot.

(B) Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines Erk 1/2 phosphorylées rapporté à la quantité de protéines Erk 1/2 totales en condition contrôle \pm SD **p<0,01 ; ns : non significatif (n=4 en duplicats).

1.3 L'activation de la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 est essentielle à la prolifération des cellules endothéliales induite par la protéine S

L'implication de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 dans la prolifération des cellules endothéliales induite par la protéine S est confirmée puisque son activation est totalement inhibée en présence d'un inhibiteur pharmacologique de cette voie, le UO126 (figure 72). De plus, MEK-1 semble être la seule responsable de la prolifération des cellules endothéliales induite par la protéine S, puisque le prétraitement avec l'inhibiteur spécifique de MEK-1, le PD 098059, inhibe là aussi totalement la prolifération des cellules endothéliales induite par la protéine S.

Ces résultats mettent en évidence le rôle mitogène de la protéine S sur les cellules endothéliales médié par la voie de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2.

2 La protéine S active la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 via le récepteur Mer

Comme cela a été précédemment le cas, nous avons utilisé la méthode d'interférence par petits ARN afin d'identifier le ou les récepteurs TAM responsables de l'effet prolifératif induit par la protéine S.

La figure 73 montre que seul le siRNA dirigé contre les ARNm du récepteur tyrosine kinase Mer a permis d'inhiber totalement la prolifération des cellules endothéliales induite par la protéine S. Ce résultat montre que le récepteur Mer est le médiateur de l'effet prolifératif induit par la protéine S. Cette inhibition totale de l'expression du récepteur Mer, observée figure 74A, conduit également à l'inhibition de 65% de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induite par la protéine S (figures 74A et B).

Nous avons ainsi démontré que le récepteur Mer médie l'effet prolifératif et l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induits par la protéine S.

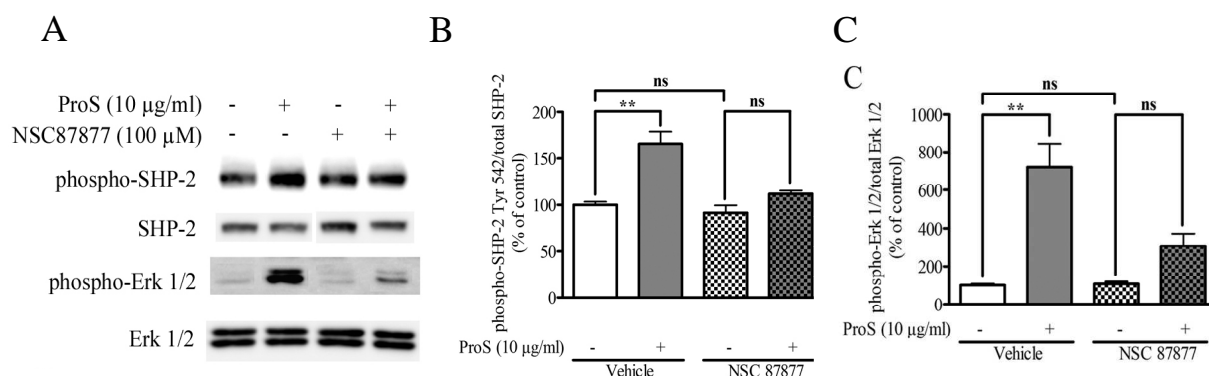


Figure 75 : Les protéines phosphatases SHPs médient l'activation de la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 induite par la protéine S

(A) Western blot représentatif de la phosphorylation de la protéine phosphatase SHP2 Tyr⁵⁴², et de Erk 1/2 Thr²⁰² et Tyr²⁰⁴ dans les HUVECs après 15 min de stimulation avec la protéine S (ProS à 10 µg/ml). Les Western blots anti-SHP2 et anti-Erk 1/2 total ont été réalisés comme contrôles de la quantité de protéines déposées. Les HUVECs préalablement carencés en SVF pendant 24 h ont été pré-traités pendant 3h avec 100 µM de NSC 87877 ou sa solution de dilution (eau distillée stérile).

Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines SHP2 (B) ou Erk 1/2 (C) phosphorylées rapporté à la quantité de protéines SHP2 ou Erk 1/2 totales en condition contrôle ± SD **p<0,01 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

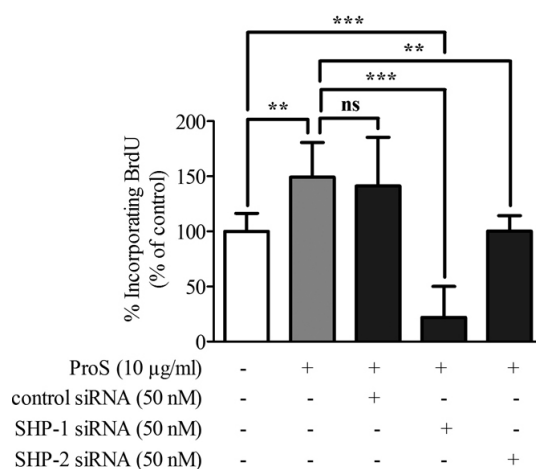


Figure 76 : La protéine phosphatase SHP2 est responsable de l'effet prolifératif exercé par la protéine S

La prolifération des HUVECs a été évaluée par mesure du taux d'incorporation de BrdU après 24 h de traitement en présence ou non de protéine S (ProS) à 10 µg/ml. Les HUVECs ont été préalablement transfectées pendant 24 h avec l'agent transfectant (contrôle) ou 50 nM de siRNA contrôle, ou 50 nM de siRNA SHP1, ou 50 nM de siRNA SHP2, avant la stimulation. Les données sont exprimées en pourcentage moyen du taux d'incorporation de BrdU du contrôle ± SD ***p<0,001 ; **p<0,01 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

3 La protéine phosphatase SHP2 médie les effets cellulaires et moléculaires induits par la protéine S

Les protéines phosphatases SHPs sont connues pour être recrutées par les récepteurs à activité tyrosine kinase et pour médier l'activation des voies de signalisation telles que la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 responsable de la prolifération cellulaire.^{328,330,337,374} Nous avons démontré que la protéine S est capable d'activer la protéine phosphatase SHP2 qui est impliquée dans son effet inhibiteur de la signalisation du VEGFA dans le chapitre précédent. Nous nous sommes alors intéressés dans ce chapitre, au rôle de ces protéines phosphatases au cours de la prolifération et de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induites par la protéine S.

3.1 Les protéines phosphatases SHPs sont responsables de l'activation de la voie de MAP-Kinases Erk 1/2 induite par la protéine S

Dans un premier temps, nous avons étudié l'implication des deux protéines phosphatases SHPs par l'utilisation de l'inhibiteur non spécifique précédemment utilisé, le NSC 87877. Comme nous l'avons précédemment montré, la protéine S augmente la phosphorylation de la protéine phosphatase SHP2 de 50% (figures 75A et B), ce qui est corrélé avec une augmentation de 7 fois de la phosphorylation de Erk 1/2 (figures 75A et C). Cette phosphorylation de la protéine phosphatase SHP2 induite par la protéine S est inhibée lorsque les cellules sont pré-traitées avec le NSC 87877 (figures 75A et B). Cette inhibition est une fois encore corrélée avec l'inhibition de 50% de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induite par la protéine S (figures 75A et C). Ces résultats mettent en évidence l'implication des protéines phosphatases SHP1 et/ou SHP2 au cours de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 par la protéine S.

3.2 La protéine phosphatase SHP2 est essentielle lors de prolifération des cellules endothéliales induite par la protéine S

Pour confirmer et identifier le rôle de chacune des protéines phosphatases SHPs dans ces conditions, nous avons réprimé leur expression en utilisant des siRNA. La figure 76 montre que seule la transfection avec le siRNA dirigé contre les ARNm de la protéine phosphatase SHP2 a inhibé la prolifération induite par la protéine S. La transfection avec le siRNA dirigé contre les ARNm de la protéine phosphatase SHP1 a totalement inhibé la prolifération des cellules endothéliales.

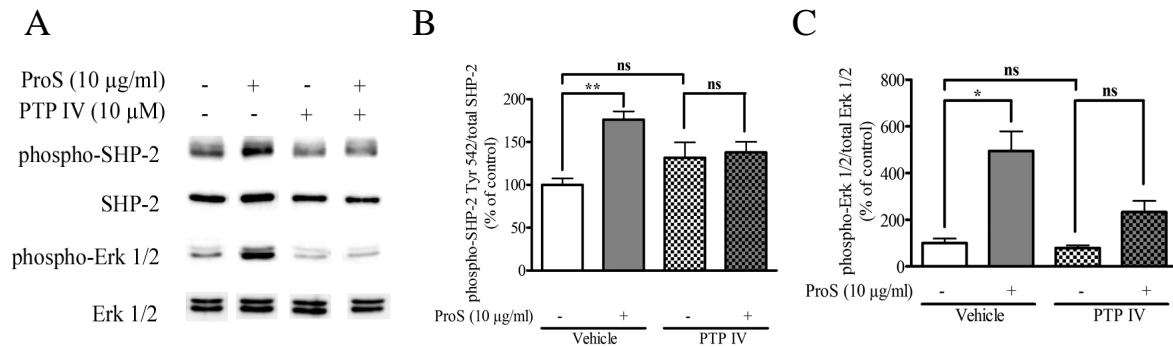


Figure 77 : La protéine phosphatase SHP2 médie l'activation de la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 induite par la protéine S

(A) Western blot représentatif de la phosphorylation de la protéine phosphatase SHP2 Tyr⁵⁴², et de Erk 1/2 Thr²⁰² et Tyr²⁰⁴ dans les HUVECs après 15 min de stimulation avec la protéine S (ProS à 10 µg/ml). Les Western blots anti-SHP2 et anti-Erk 1/2 total ont été réalisés comme contrôles de la quantité de protéines déposées. Les HUVECs préalablement carencées en SVF pendant 24 h ont été prétraitées pendant 1 h avec 10 µM de PTP IV ou sa solution de dilution (DMSO).

Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines SHP2 (B) ou Erk 1/2 (C) phosphorylées rapporté à la quantité de protéines SHP2 ou Erk 1/2 totale en condition contrôle ± SD **p<0,01 ; *p<0,05 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

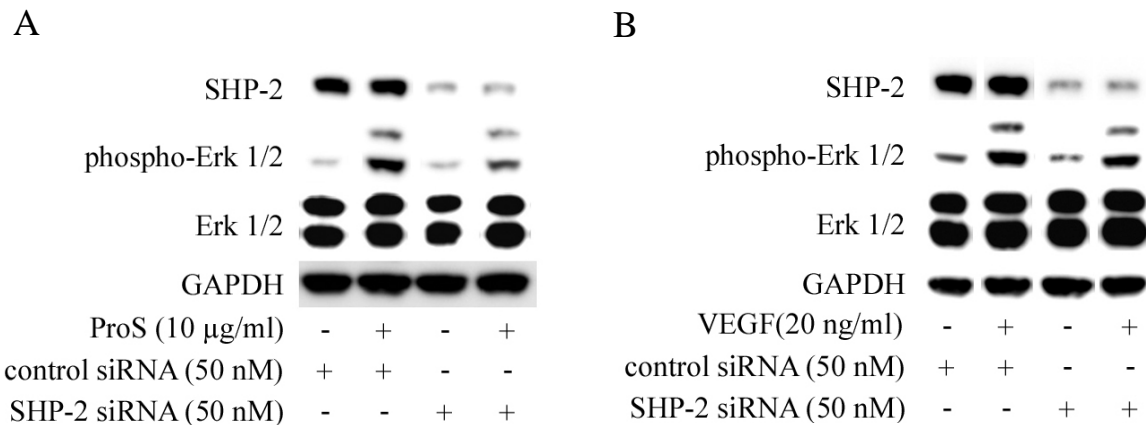


Figure 78 : La protéine phosphatase SHP2 médie spécifiquement l'activation de la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 induite par la protéine S

Western blot représentatif de la phosphorylation de Erk 1/2 Thr²⁰² et Tyr²⁰⁴ dans les HUVECs après 15 min de stimulation avec la protéine S (ProS à 10 µg/ml) (A), ou avec le VEGFA (20 ng/ml) (B). La répression de l'expression de la protéine phosphatase SHP2 a été vérifiée par Western blot. Enfin, les Western blots anti-Erk 1/2 total et anti-GAPDH ont été réalisés comme contrôle de la quantité de protéines déposées. Les HUVECs préalablement transfectées pendant 24 h avec 50 nM de siRNA contrôle ou de siRNA SHP2 ont été ensuite carencées en SVF pendant 24 h (n=1).

3.3 La protéine SHP2 médie l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induite par la protéine S

Nous avons par la suite focalisé notre étude sur le rôle spécifique de la protéine phosphatase SHP2 par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'activation de la protéine phosphatase SHP2, le PTP IV^{374,543} ou par l'utilisation de siRNA dirigés contre les ARNm de la protéine SHP2.

Les figures 77A et B montrent que la protéine S augmente de 50% la phosphorylation de la protéine phosphatase SHP2. Cette phosphorylation est de nouveau corrélée à une augmentation de 5 fois du niveau de phosphorylation de Erk 1/2 induite par la protéine S (figures 77A et C). Le prétraitement des cellules endothéliales avec l'inhibiteur PTPT IV a totalement inhibé la phosphorylation de la protéine phosphatase SHP2 (figures 77A et B) et a diminué de 50% la phosphorylation de Erk 1/2 (figures 77A et C) induites par la protéine S. Ces résultats montrent que la protéine phosphatase SHP2 est impliquée lors l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induite par la protéine S.

Ces résultats sont confirmés par l'utilisation des siRNA. Lorsque les cellules sont transfectées avec un siRNA contrôle la protéine S induit toujours la phosphorylation de Erk 1/2. La diminution de l'expression de la protéine phosphatase SHP2 est corrélée à une diminution du taux de phosphorylation de Erk 1/2 induit par la protéine S (figure 78A). Comme cela a déjà été démontré, le VEGFA est capable d'induire la phosphorylation de Erk 1/2 et de la protéine phosphatase SHP2. Cependant, la protéine phosphatase SHP2 n'est pas essentielle à l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induite par le VEGFA, puisque la répression de son expression ne diminue pas le taux de phosphorylation de Erk 1/2 induit par le VEGFA (figure 78B). Les mécanismes mis en jeu lors de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 par le VEGFA ou la protéine S sont différents. En effet, l'activation de la voie de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2 par la protéine S nécessite le recrutement de la protéine phosphatase SHP2, alors que cette activation par le VEGFA ne le nécessite pas.

La protéine S active la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 via un mécanisme original dépendant du recrutement de la protéine phosphatase SHP2.

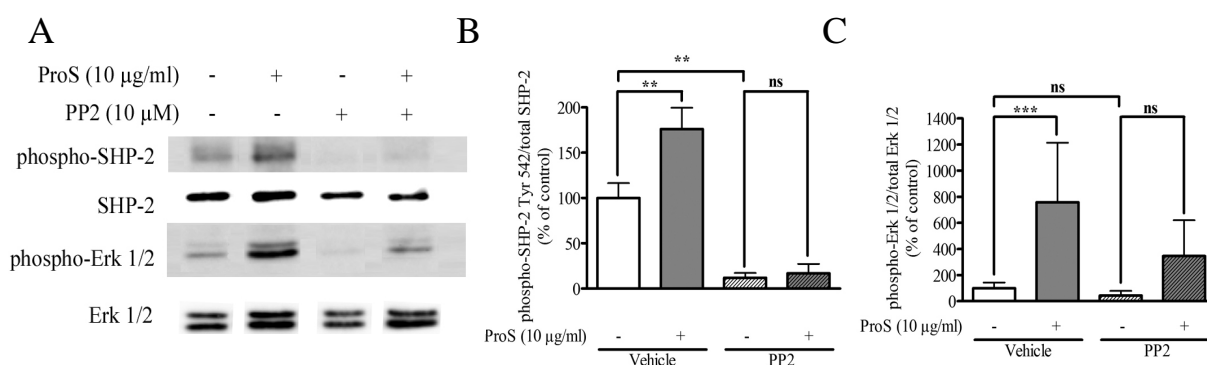


Figure 79 : L'inhibition de l'activité de la protéine c-Src supprime le recrutement de la protéine phosphatase SHP2 et l'activation de la voie des MAP-Kinase Erk 1/2 induits par la protéine S

(A) Western blot représentatif de la phosphorylation de la protéine phosphatase SHP2 Tyr⁵⁴², et de Erk 1/2 Thr²⁰² et Tyr²⁰⁴ dans les HUVECs après 15 min de stimulation avec la protéine S (ProS à 10 µg/ml). Les Western blots anti-SHP2 et anti-Erk 1/2 total ont été réalisés comme contrôles de la quantité de protéines déposées. Les HUVECs préalablement carencées en SVF pendant 24 h avant ont été prétraitées pendant 1 h avec 10 µM de PP2 ou sa solution de dilution (DMSO).

Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines SHP2 (B) ou Erk 1/2 (C) phosphorylées rapporté à la quantité de protéines SHP2 ou Erk 1/2 totales en condition contrôle ± SD ***p<0,001 ; **p<0,01 ; ns : non significatif (n=3 en triplicats).

4 La protéine c-Src médie la signalisation induite par la protéine S

Les interactions entre la protéine kinase c-Src et la protéine phosphatase SHP2 sont multiples. De nombreuses études ont démontré que la protéine kinase c-Src constitue une cible intracellulaire pour la protéine phosphatase SHP2.^{328,330,544,545} En effet, la protéine phosphatase SHP2 participe à l'activation de la protéine kinase c-Src en déphosphorylant le résidu Tyr⁵²⁹ responsable de son inactivation. Ce phénomène est à l'origine de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induite par la protéine phosphatase SHP2 en réponse à la stimulation par l'EGF.³⁶⁵ Zhiping Li et coll., montrent que la protéine kinase c-Src est responsable de l'activation de la protéine phosphatase SHP2, puis de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 en réponse à une stimulation par l'EGF.⁵⁴⁶

Nous nous sommes intéressés à l'implication de la protéine kinase c-Src au cours de l'activation de la protéine phosphatase SHP2 et de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induites par la protéine S. Pour cela nous avons utilisé un inhibiteur de l'activité des protéines kinases de la famille Src, le PP2 à 10 μ M.⁵⁴⁶⁻⁵⁴⁹ Le prétraitement avec le PP2 a totalement aboli aussi bien la phosphorylation de la protéine phosphatase SHP2 induite par la protéine S que celle induite de manière endogène (figures 79A et B). Cette inhibition est corrélée avec la diminution de 50% de la phosphorylation de Erk 1/2 induite par la protéine S (figures 79A et C). Ces observations mettent en évidence le rôle de la protéine kinase c-Src lors du recrutement de la protéine phosphatase SHP2 puis de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induits par la protéine S.

La protéine kinase c-Src médie le recrutement de la protéine phosphatase SHP2 et l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induits par la protéine S.

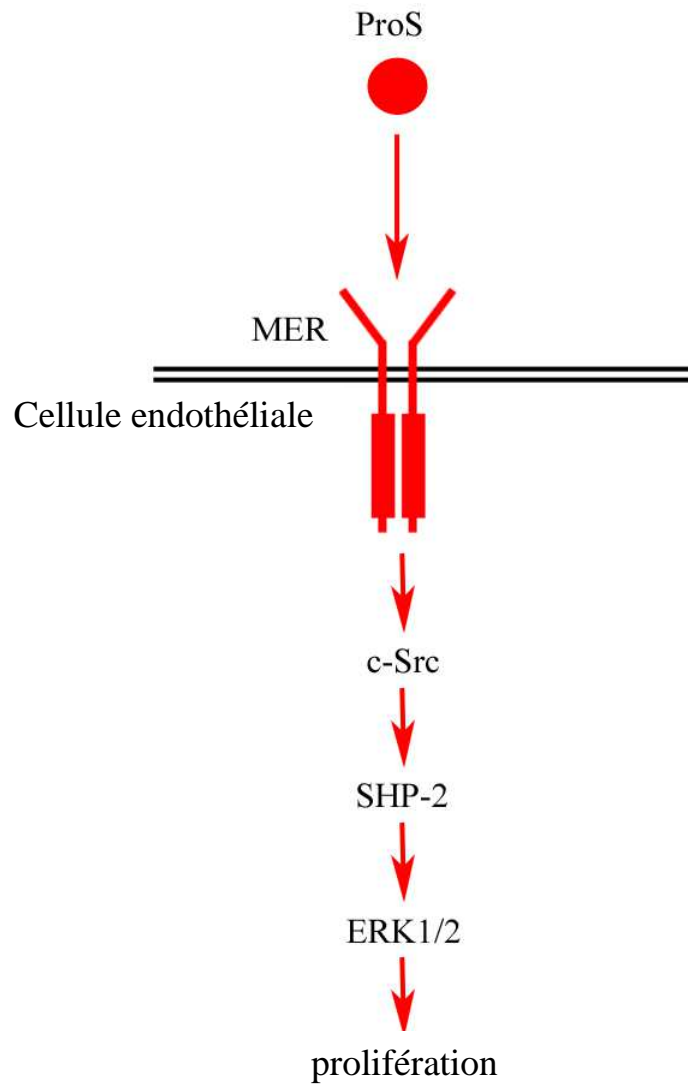


Figure 80 : La protéine S, un agent mitogène pour les cellules endothéliales

Schéma récapitulatif représentant la voie de signalisation activée *in vitro* lors de la prolifération des cellules endothéliales induite par la protéine S (ProS).

5 Conclusion : la protéine S est un agent mitogène pour les cellules endothéliales

Nos résultats montrent que la protéine S, active son récepteur tyrosine kinase Mer. Cette activation permet par la suite le recrutement et la phosphorylation de la protéine kinase c-Src sur son site d'activation (Tyr⁴¹⁶), elle-même à l'origine de l'activation de la protéine phosphatase SHP2. La protéine phosphatase SHP2 induit la phosphorylation et donc l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 par un mécanisme restant à déterminer. Cette activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 est finalement responsable de la prolifération des cellules endothéliales induite par la protéine S (figure 80).

Discussion et perspectives

Dans un premier chapitre, nous avons montré que la protéine S inhibe la vascularisation des bouchons de Matrigel *in vivo* ainsi que des événements cellulaires associés à l'angiogenèse induits par le VEGFA *in vitro* tels que la formation de structures capillaires, la migration et la prolifération des cellules endothéliales (figures 47, 48, 49, 51 et 53). Nous démontrons que cette action inhibitrice est due au blocage par la protéine S de voies de signalisation activées par le VEGFA telles que la phosphorylation du VEGFR2, de Akt et des MAP-Kinases Erk 1/2. La protéine S inhibe la signalisation intracellulaire induite par le VEGFA grâce au recrutement de la protéine phosphatase SHP2 consécutif à l'activation du récepteur à activité tyrosine kinase Mer par la protéine S (figures 52, 54 et 55 à 66).

Il n'est pas à exclure qu'en partie au moins, l'inhibition de l'angiogenèse *in vivo* chez la souris, induite par la protéine S puisse être due à son rôle anticoagulant. En effet, la protéine S est bien connue pour son rôle anticoagulant en tant que cofacteur de la protéine C activée,³⁸⁷ mais aussi de manière directe.^{393-396,399} L'observation de défauts de vascularisation consécutifs à la régression des vaisseaux sanguins due à leur occlusion par des thromboses chez les souris *PROS*^{-/-} suggère que la protéine S est nécessaire au développement du système vasculaire.⁴⁰⁴ De plus, la protéine S circule dans le plasma humain majoritairement sous forme liée à la protéine C4b-BP.^{379,381,383-386} Cependant, ce complexe n'existe pas chez la souris étant donné que chez la souris, le gène codant pour la chaîne β de la protéine C4b-BP est un pseudogène ; la protéine S circule donc perpétuellement sous forme libre.³⁸⁸ Dans notre modèle *in vivo* de bouchon de Matrigel, la protéine S est présente de manière locale dans l'implant et non de manière circulante, limitant de ce fait son activité anticoagulante et argumentant de ce fait pour une action directe sur les cellules composant les vaisseaux sanguins telles que les cellules endothéliales exprimant les récepteurs à activité tyrosine kinase TAM. En outre, l'inhibition de l'expression du récepteur Mer par siRNA supprime l'effet inhibiteur dans le test de morphogenèse, corroborant le rôle inhibiteur de la protéine S médié par le récepteur Mer indépendamment de son rôle anticoagulant.

L'implication des protéines Vitamine K-dépendantes au cours de l'angiogenèse a été suggérée en 2005 par Wang et coll.⁵⁵⁰ Cette équipe a démontré que la surexpression de la Vitamine K Epoxide Réductase (VKOR) permettant le recyclage de la vitamine K lors de la réaction de la γ -carboxylation augmente la prolifération, la migration, l'adhérence ainsi que la formation du réseau capillaire par les HUVECs. En accord avec ces observations, l'inhibition

de l'expression de la VKOR inhibe la prolifération, la migration, l'adhérence ainsi que la formation du réseau capillaire par les HUVECs. Ces résultats suggèrent que la vitamine K et de fait, les facteurs dépendants de la vitamine K tels que la protéine S jouent un rôle important lors de l'angiogenèse.⁵⁵⁰ Cependant, nos résultats, portant sur la protéine S ainsi que celle menée par Gallicchio et coll. portant sur la protéine Gas6 démontrent que, au contraire, ces protéines ont un rôle anti-angiogénique. Outre la protéine Gas6 et la protéine S, il existe d'autres protéines vitamine K-dépendantes, comme cela a été décrit dans le chapitre d'introduction (tableaux 3 et 4) pouvant expliquer l'effet angiogénique induit par la VKOR. Il a été montré que, parmi les membres de la famille des protéines vitamine K-dépendantes, la thrombine (Facteur II)⁵⁵¹⁻⁵⁵⁷, le Facteur X⁵⁵⁸ et la protéine C⁵⁵⁹ jouent un rôle pro-angiogénique via les récepteurs activés par les protéases 1 et/ou 2 (PAR, Proteinase Activated Receptor). Ces observations posent pleinement la question de la complexité du ou des rôle(s) de la vitamine K dans l'angiogenèse.

Les cellules endothéliales tapissent les vaisseaux sanguins et sont en contact permanent avec le sang et donc avec la protéine S circulante. Nous avons démontré au laboratoire que la protéine S inhibe directement la formation de réseaux capillaires *in vitro* par les cellules endothéliales (figure 49). Nous avons ensuite montré que cet effet est médié par le récepteur Mer et la protéine phosphatase SHP2 (figure 68). Nous avons utilisé l'endostatine, un inhibiteur connu de l'angiogenèse, comme contrôle positif au cours de nos expériences. Nous avons ainsi observé, comme cela avait été précédemment décrit,^{235,241} que l'endostatine à la concentration de 10 µg/ml inhibe l'angiogenèse *in vitro* (figure 49). L'activité inhibitrice de la formation du réseau de cellules endothéliales exercée par la protéine S est similaire à celle exercée par l'endostatine, suggérant que le potentiel anti-angiogénique de la protéine S est important.

Comme nous l'avons précédemment abordé dans le chapitre d'introduction, la formation du réseau capillaire résulte de la succession de plusieurs événements cellulaires tels que la dilatation et la perméabilité vasculaire, la dégradation de la matrice extracellulaire puis la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Ces événements cellulaires sont finement régulés par les facteurs pro-angiogéniques dont le VEGFA est le principal acteur. Nous avons démontré que la protéine S inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales induites par le VEGFA. Le rôle joué par la protéine S lors de la phase précoce de dilatation et perméabilité vasculaire puis dans la phase suivante de dégradation de la matrice extracellulaire n'a pas été exploré dans cette étude mais constitue des perspectives sérieuses pour la suite de notre travail. Cependant, l'altération de la perméabilité des

vaisseaux sanguins chez les souris hétérozygotes pour le gène *PROS1* ainsi que chez les souris dont l'expression du gène *PROS1* a été spécifiquement supprimé dans les cellules musculaires lisses vasculaires a été démontré *in vivo* suggérant que la protéine S, outre l'inhibition de la prolifération et de la migration induite par le VEGFA, régule aussi la perméabilité vasculaire.⁴⁰⁴ Des problèmes d'hémorragies cérébrales ont également été observés chez les souris dont le gène codant pour chacun des récepteurs TAM a été supprimé.^{476,477} Ensemble, ces observations suggèrent que la protéine S et ses récepteurs TAM jouent un rôle important dans la perméabilité vasculaire.

Nous avons observé que la protéine S inhibe la migration des cellules endothéliales dépendante du VEGFA en interférant avec la voie de signalisation de la PI3K/Akt. En outre, la migration est un processus étroitement dépendant des interactions entre les cellules endothéliales et les protéines de la matrice extracellulaire assurées par des protéines d'adhérence comme les intégrines et la dégradation de la matrice extracellulaire assurée par les protéases telles que les MMPs.^{18,22,23} Il semble donc possible que la protéine S régule l'expression de certaines intégrines et l'activité des MMPs afin de limiter les capacités invasives des cellules endothéliales. Ces deux aspects n'ont pas été étudiés à l'heure actuelle et n'ont pas été abordé dans le cadre de ma thèse. Il serait intéressant d'étudier le rôle joué par la protéine S sur l'invasion des cellules endothéliales à travers la lame basale par l'utilisation du modèle de la chambre de Boyden. Par la suite, il serait intéressant d'étudier le rôle joué par la protéine S sur l'activité gélatinase des MMP-2 et MMP-9 connues pour leur implication lors de la dégradation de la matrice extracellulaire par les cellules endothéliales.⁴ Des études ont également montré que les intégrines telles que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, jouent un rôle prépondérant lors de l'angiogenèse, notamment en s'associant puis en médiant l'activation et la signalisation du VEGFR2.^{560,561} De plus, des études ont démontré que l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ et le récepteur Mer peuvent induire l'activation de voies de signalisation bidirectionnelles entre eux, grâce à l'activation des kinases FAK et des protéines de la famille Src.⁵⁶²⁻⁵⁶⁴ La régulation de l'expression des intégrines par la protéine S et le récepteur Mer constitue une nouvelle voie de recherche à explorer.

Nous avons également démontré que la protéine S inhibe spécifiquement la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGFA en interférant avec la voie de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2. De manière intéressante nous avons observé une diminution partielle de la prolifération induite par le VEGFA (diminution de 50%) corrélée à une diminution similaire de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 activée par le VEGFA en présence de protéine S (figure 52). Ces observations nous ont permis d'émettre les

hypothèses suivantes : soit la protéine S n'a pas une activité inhibitrice suffisamment importante pour réverser entièrement l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induite par le VEGFA, soit la protéine S induit elle-même un niveau d'activation faible de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2. Nous avons finalement observé que la stimulation des cellules endothéliales, en absence de facteur de croissance, induit la phosphorylation des MAP-Kinases Erk 1/2, suggérant ainsi que la protéine S induit elle-même un faible taux d'activation de cette voie de signalisation (figures 71A et B).

Nous nous sommes ensuite intéressés au mode d'action exercé par la protéine S. Dans ce contexte, deux hypothèses se sont présentées :

- Soit la protéine S agit comme un antagoniste compétitif pour la fixation du VEGFA sur son récepteur VEGFR2 comme cela est le cas pour le bevacizumab (Avastin®), le peptide synthétique (ATWLPPR),^{565,566} ou encore pour l'endostatine.²³⁵ L'endostatine et la protéine S partageraient ainsi non seulement la même efficacité mais aussi le même mécanisme d'action.
- Soit la protéine S diminue le taux d'activation du VEGFR2 induit par le VEGFA en recrutant une protéine phosphatase, comme cela est le cas pour le recrutement de la protéine phosphatase SHP1 recrutée par l'inhibiteur des MMPs TIMP2,^{286,289} ou la protéine phosphatase SHP2 recrutée par la protéine Gas6 (homologue structural de la protéine S).³²²

Au cours de nos expériences, nous avons observé que la protéine S diminue la phosphorylation du site Tyr⁹⁹⁶ VEGFR2 mais pas du site Tyr¹¹⁷⁵. Nous en avons déduit qu'il ne pouvait pas s'agir d'une inhibition de la fixation du VEGFA sur son récepteur. En effet, si tel avait été le cas, la phosphorylation des deux sites de phosphorylation aurait été inhibée.

Nous avons ensuite utilisé un inhibiteur des protéines phosphatases SHP1 et SHP2 et confirmé l'implication de celles-ci lors de la déphosphorylation du site Tyr⁹⁹⁶ du VEGFR2 induite par la protéine S (figure 55). En outre, le site de phosphorylation Tyr¹¹⁷⁵, dont la phosphorylation n'est pas affectée par la protéine S, est sensible à la déphosphorylation par la protéine phosphatase SHP1^{319,567} mais pas par la protéine phosphatase SHP2.³²¹ Ces résultats ont été confirmés grâce à la méthode d'interférence par petits ARN (figure 60). De plus, nous avons démontré que la protéine S, tout comme la protéine Gas6,³²² active la protéine phosphatase SHP2 par phosphorylation de son résidu Tyr⁵⁴² (figure 61). Ces résultats démontrent que la protéine phosphatase médie l'effet anti-angiogénique exercé par la protéine S. Plus indirectement, la déphosphorylation du VEGFR2 par la protéine phosphatase SHP2 a déjà été mise en évidence suite au traitement des cellules endothéliales avec la protéine Gas6,³²² la dopamine,³²¹ ainsi que par la présence de collagène de type I.³²⁰

| | Cellules endothéliales ^{528,568} | Macrophages ⁴³⁹ | Rétine ^{446,447} | Système nerveux central | |
|---|--|---------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---|
| | | | | Neurones ^{436,437} | Cellules endothéliales ⁴⁴⁰ |
| Expression des récepteurs TAM | Axl (+) Mer Tyro3 (-) | Mer (+) Axl (-) Tyro3 (-) | Tyro3 Axl Mer | Tyro3 Axl Mer | Tyro3 (+) Axl (+) Mer (nd) |
| Récepteur responsable des effets cellulaires de la protéine S | Mer | Mer | Mer Tyro3 | Tyro3 | Tyro3 |

Tableau 12 : Expression des récepteurs TAM et leur implication dans les effets cellulaires induits par la protéine S

(+) : fortement exprimé

(-) : faiblement exprimé

(**nd**) : non détecté

Nous avons aussi observé que, lorsque l'expression de la protéine phosphatase est inhibée dans les cellules endothéliales, celles-ci ont tendance à former un réseau capillaire plus dense (figure 68). Ces observations sont en accord avec les études suggérant que la protéine phosphatase SHP2 est une protéine de signalisation anti-angiogénique.^{320-322,363}

Lors de nos expériences, nous avons constaté que la répression de l'expression du gène codant pour la protéine phosphatase SHP1 inhibe totalement la prolifération des cellules endothéliales (figure 60). Ce résultat est similaire à celui décrit dans une autre étude menée sur des cellules du cancer de la prostate,⁵⁶⁹ qui a démontré que l'inhibition de l'expression du gène codant pour la protéine phosphatase SHP1 augmente la stabilité, l'expression et la localisation nucléaire de la protéine inhibitrice de la transition entre la phase G1 et la phase S du cycle cellulaire, la protéine p27. La voie de signalisation de la PI3K pourrait être impliquée dans cette activité étant donné que la protéine phosphatase SHP1 régule l'activité de la PI3K ainsi que celle de sa sous-unité p110. Nous suggérons ainsi que la protéine phosphatase SHP1 est nécessaire pour le bon fonctionnement d'événements qui régissent la progression du cycle cellulaire.

Par la suite, nous avons démontré que les HUVECs expriment les trois récepteurs TAM de la protéine S (figure 62), conformément à ce qui avait été décrit dans une étude précédente,⁵²⁸ et que le récepteur responsable des effets anti-angiogéniques de la protéine S est le récepteur Mer (figure 64). Néanmoins les effets cellulaires induits par la protéine S diffèrent fortement selon le récepteur TAM impliqué. L'activation du récepteur Tyro3 par la protéine S protège les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique⁴⁴² ainsi que les neurones⁴³⁷ de l'apoptose ; l'activation du récepteur Mer par la protéine S permet la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages^{438,439} et inhibe l'angiogenèse induite par le VEGFA.⁵⁶⁸ De plus, la protéine S a une affinité différente pour les récepteurs TAM et est considérée comme un ligand de faible affinité pour ceux-ci.^{424,443} Dans ce contexte, il semble que le rôle joué par la protéine S via ses récepteurs TAM est fortement corrélé à son affinité pour les récepteurs TAM ainsi qu'à leur profil d'expression spatio-temporel (tableau 12). Ainsi, nous suggérons qu'en absence du récepteur Tyro3, pour lequel la protéine S a la plus forte affinité, la protéine S se lie et active préférentiellement le récepteur Mer afin d'induire ses effets cellulaires.

Nous démontrons que la protéine S humaine est capable d'activer le récepteur Mer humain dans les cellules endothéliales (figures 66A et B), comme cela a été démontré par d'autres équipes dans les macrophages,^{438,439} ainsi que le récepteur Mer murin (figure 66C et D).

Nous avons également pu observer que l'inhibition de l'expression du récepteur Mer semble diminuer la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales (figure 68). Ces résultats suggèrent que le récepteur Mer pourrait participer à la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales comme cela a déjà été démontré pour le récepteur Axl.^{491,498} Actuellement, aucune étude n'a démontré l'activation du récepteur Axl par la protéine S.

Alors que nous menions nos expériences afin de déterminer le récepteur impliqué dans les effets anti-angiogéniques de la protéine S, une autre étude a démontré que l'activation du récepteur Mer par Gas6 inhibe la migration des cellules endothéliales induite par les cellules tumorales.⁵²⁵ Ces résultats corroborent nos observations concernant l'activation du récepteur Mer par ses ligands et son rôle anti-angiogénique. Cette même étude a également démontré que l'expression du miR-126 pro-angiogénique induit la production et la sécrétion de la forme soluble du récepteur Mer qui est capable de neutraliser la protéine Gas6 empêchant ainsi sa liaison au récepteur Mer et son activation, nécessaires à l'inhibition de la migration des cellules endothéliales.⁵²⁵ Nous suggérons qu'un système analogue de neutralisation de la protéine S par le récepteur Mer soluble, qui serait sécrété par les cellules tumorales, puisse exister permettant la neutralisation de la protéine S, empêchant de ce fait sa capacité endogène à inhiber l'angiogenèse. Il serait intéressant de déterminer si la forme soluble du récepteur Mer est capable de se lier à la protéine S et d'inhiber son effet anti-angiogénique. Par la suite, il serait intéressant d'explorer l'implication des miRNA pro- ou anti-angiogéniques (tableau 1), et notamment du miRNA-126, qui réprime l'expression du gène codant pour le récepteur Mer favorisant ainsi la production de sa forme soluble, dans le rôle anti-angiogénique exercé par la protéine S.

Au cours de cette étude, nous avons également pu observer que la protéine S n'inhibe pas seulement les événements cellulaires dépendants du VEGFA, mais aussi ceux induits par synergie entre le VEGFA et le FGF2 *in vivo* et *in vitro* (figures 47, 51C et 65). Nous suggérons que la protéine S pourrait également inhiber l'activation des voies de signalisation et les événements cellulaires induits par le FGF2. Nous n'avons pas étudié dans le cadre de ma thèse le rôle joué par la protéine S sur la signalisation induite par le FGF2, mais cela pourrait être une perspective potentielle de ce travail.

Dans un deuxième chapitre, nous avons montré que la protéine S induit directement la prolifération des cellules endothéliales (figure 70). Cet effet passe par l'activation de la voie de signalisation du récepteur Mer, le recrutement de la protéine kinase Src, l'activation de la protéine phosphatase SHP2 et finalement l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 (figure 71 à 79). Cette stimulation de la prolifération des cellules endothéliales induite par la protéine S est supprimée en présence des inhibiteurs de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 (UO126 et PD098059) (figure 72). D'après nos observations, la MAP-Kinase MEK 1 serait plus particulièrement impliquée dans l'effet prolifératif induit par la protéine S (figure 72). Un phénomène similaire a été décrit dans la littérature à propos de la prolifération des cellules endothéliales induite par le FGF2.⁵⁷⁰

Nous montrons aussi dans cette étude que la protéine S est capable d'induire la prolifération des cellules endothéliales et l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 en absence de facteurs de croissance (figures 70 et 71). C'est la première fois que la protéine S est présentée comme un facteur mitogène pour les cellules endothéliales. Cependant, il a déjà été démontré que la protéine S d'origine murine induit la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires humaines et murines⁴²⁷ et que de la protéine S humaine induit la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires humaines.⁵²⁶

De manière intéressante, nous constatons que le taux de prolifération induit par la protéine S coïncide exactement avec le taux de prolifération résiduel observé lors des expériences de prolifération des cellules endothéliales co-traitées avec le VEGFA (figures 51 et 70). Nous suggérons que la protéine S pourrait avoir une double fonction sur les cellules endothéliales :

- Limiter la prolifération exacerbée induite par les facteurs pro-angiogéniques comme le VEGFA.

- Maintenir un taux de prolifération basale afin de permettre le renouvellement des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et plus largement de permettre le maintien de l'homéostasie vasculaire en agissant également sur les cellules musculaires lisses vasculaires, pour initier par exemple la réparation vasculaire suite à une lésion. La protéine S agirait ainsi comme un régulateur endogène du système vasculaire régulant finement sa croissance et son fonctionnement. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'anomalies vasculaires chez les individus *ProS*^{-/-}.⁴⁰⁴

Grâce à l'utilisation de la technique d'interférence par petits ARN nous avons démontré que le récepteur Mer est responsable de la prolifération (figure 73) ainsi que de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induits par la protéine S (figure 74). Nous

observons que la phosphorylation de Erk 1/2 par la protéine S n'est pas totalement inhibée lorsque l'expression du récepteur Mer est inhibée (figure 74). Ceci pourrait être expliqué par l'activation du récepteur Tyro3 présent à la surface des cellules endothéliales. En effet, une étude a démontré que l'activation du récepteur Tyro3 par la protéine Gas6 induit l'activation de la voie de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2 dans les ostéoclastes, aboutissant à la résorption osseuse.⁴⁸¹

Nous avons également observé une activation forte de la voie de signalisation de la PI3K par le traitement des cellules endothéliales avec la protéine S comparativement à l'activation de la voie de la PI3K induite par le VEGFA (figures 71C et D). Ce résultat a également été observé par d'autres équipes dans les neurones^{436,437} et dans les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique⁴⁴⁰ suite à l'activation du récepteur Tyro3. L'activation de la voie de signalisation de la PI3K par la protéine S dans les neurones a eu pour effet d'augmenter leur résistance à l'apoptose.⁴³⁷ D'après nos résultats, il serait intéressant d'étudier le rôle de la protéine S et de la voie de la PI3K lors de la résistance des cellules endothéliales à l'apoptose. Nous n'avons pas étudié l'implication du récepteur Mer lors de l'activation de la voie de signalisation de la PI3K par la protéine S dans les cellules endothéliales. Cependant, l'activation de la voie de signalisation de la PI3K par le récepteur et son implication lors de la prolifération cellulaire a déjà été démontrée dans les cellules fibroblastiques de souris NIH3T3.⁴⁵⁶

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et de siRNA nous a permis de démontrer que la protéine phosphatase SHP2 est impliquée lors de la prolifération et de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 induite par la protéine S dans les cellules endothéliales (figures 75 à 78). L'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 par la protéine phosphatase SHP2 a également été démontrée dans les cellules musculaires lisses aortiques de rat après stimulation avec le PDGF-BB.⁵⁷¹ Le mécanisme que nous présentons est original puisque nous démontrons que la protéine S requiert l'expression de la protéine phosphatase SHP2 afin d'activer la voie de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2 contrairement au VEGFA (figure 78). Plusieurs mécanismes d'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 via la protéine phosphatase SHP2 ont été mis en évidence :

- Soit la protéine phosphatase SHP2 déphosphoryle directement les protéines inhibitrices de Ras (RasGap³⁶⁴ et Sprouty^{323,328,330}).
- Soit la protéine phosphatase SHP2 active directement la protéine kinase Src en déphosphorylant son résidu tyrosine inhibiteur Tyr⁵²⁹.³³⁰

- Soit la protéine phosphatase SHP2 active indirectement la protéine kinase Src en déphosphorylant la protéine Csk, levant de ce fait l'inhibition de Src induite par Csk.^{328,330,365}

Nous avons mis en évidence l'implication de la protéine Src lors de la phosphorylation de Erk 1/2 induite par la protéine S en utilisant un inhibiteur pharmacologique de son activité. Nous montrons que le prétraitement avec cet inhibiteur a totalement supprimé la phosphorylation endogène de la protéine phosphatase SHP2 et celle induite par la protéine S (figure 79). Ce rôle de la protéine kinase Src lors de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2 est en accord avec les résultats d'une autre équipe concernant la stimulation de cellules cancéreuses mammaires avec l'Epidermal Growth Factor (EGF)⁵⁴⁶. De ce fait, nous suggérons que la protéine Src est recrutée en amont de l'activation de la protéine phosphatase SHP2 induite par la protéine S. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'état de phosphorylation du résidu tyrosine inhibiteur (Tyr⁵²⁹) de la protéine kinase Src suite à la stimulation des cellules endothéliales par la protéine S. Il a été en effet démontré que la protéine phosphatase SHP2 est capable d'activer la protéine Src directement par déphosphorylation de ce résidu tyrosine.³³⁰

A l'heure actuelle, l'implication du couple Protéine S/Mer a surtout été démontrée lors de la régulation de la phagocytose par les macrophages^{431,438,439} et par les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine.^{446,447} La protéine S est capable de se lier par l'intermédiaire de son domaine γ -carboxylé aux phospholipides chargés négativement tels que les phosphatidylsérines oxydées exposées à la surface des cellules apoptotiques.⁴³² Cette liaison aux cellules apoptotiques appelée signal « mangez-moi » (« eat me signal ») permet à la protéine S de se lier par son domaine SHBG au récepteur Mer présent à la surface des phagocytes et de l'activer, entraînant ainsi la phagocytose des cellules apoptotiques.^{410,447} Ainsi, la protéine S agit en tant qu'opsonine avec les récepteurs TAM comme cela a été montré pour la protéine MFG-E8 (*milk fat globule EGF factor 8*) dont les récepteurs sont les intégrines $\alpha\text{v}\beta 3/\alpha\text{v}\beta 5$.⁵⁷² L'activation du récepteur Mer par la protéine S active de multiples voies de signalisation telles que la phospholipase $\text{C}\gamma$,⁵⁰⁷ la voie des kinases d'adhérences focales (Focal-Adhesion Kinase, FAK),⁵⁷³ l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 5$ ^{573,574} et la cascade de signalisation Rho-GTPase Rac1 associée au cytosquelette qui régule la polymérisation des filaments d'actine permettant un changement de la morphologie du macrophage ainsi que l'internalisation de la cellule apoptotique.^{507,564} L'activation du récepteur Mer par Gas6 conduit au recrutement de la PI3K et de la phospholipase $\text{C}\gamma$, et à la phosphorylation de Vav1, activant de ce fait la cascade de signalisation Rho-GTPase Rac1 et favorisant ainsi la phagocytose de cellules apoptotiques.⁵⁰⁷ La capacité des cellules endothéliales à phagocyter

des cellules en apoptose a été mise en évidence *in vitro*.^{575,576} D'après toutes ces données, nous suggérons que la protéine S pourrait également jouer un rôle lors du développement et lors de l'homéostasie du système vasculaire en régulant la phagocytose des cellules vasculaires apoptotiques par les macrophages et les cellules endothéliales. Il a été démontré que l'activation du récepteur Mer par la protéine S nécessitait l'auto-oxydation des résidus cystéines de la protéine S induisant par la suite son oligomérisation.⁴³⁸ Les phosphatidylsérines présentes à la surface des cellules apoptotiques servent de support pour l'oligomérisation de la protéine S. Cette oligomérisation serait nécessaire pour l'activation du récepteur Mer et l'induction de la phagocytose par les phagocytes professionnels ou non professionnels. Nous n'avons pas étudié, dans notre système, si l'oligomérisation de la protéine S a lieu. Il est raisonnable d'émettre l'hypothèse que, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, les cellules endothéliales apoptotiques dans les cultures cellulaires ou au sein des vaisseaux sanguins servent de support pour l'oligomérisation de la protéine S afin d'activer par la suite le récepteur Mer.

Si l'implication du couple protéine S/Mer a été largement étudiée au cours de la phagocytose, d'autres ligands du récepteur Mer présentent ces mêmes propriétés. Il a été démontré depuis longtemps que la protéine Gas6 permet la phagocytose des cellules apoptotiques par les cellules de sertoli,⁵¹³ les macrophages^{462,577} et les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine.^{446,447,578,579} Récemment trois nouveaux ligands potentiels du récepteur Mer ont été découverts : il s'agit des protéines Tubby, Tubby-like protein 1 (Tulp1)⁵⁸⁰ et Galectin-3.⁵⁸¹ Ces trois ligands induisent la phagocytose de cellules apoptotiques et de débris cellulaires par les macrophages et les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine.^{580,581} La protéine Tubby régule également la phagocytose des cellules apoptotiques par la microglie via l'activation du récepteur Mer, suggérant que le récepteur Mer joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du système nerveux central.⁵⁸² Enfin, à la différence de la protéine Tubby qui n'est capable de se lier qu'au récepteur Mer, il a été montré que la protéine Tulp1 peut se lier aux trois récepteurs TAM.⁵⁸⁰ Cette intéressante découverte suggère que la protéine Tulp1 pourrait réguler d'autres fonctions cellulaires, notamment le développement du système vasculaire, en activant les récepteurs TAM. L'activation des récepteurs Tyro3 et Axl par la protéine Tulp1 ainsi que les effets de Tubby, Tulp1 et Galectin-3 dans l'angiogenèse n'ont pas été étudiés à l'heure actuelle, mais seraient des voies intéressantes à explorer dans notre système.

Nous démontrons dans ce travail que la protéine S joue deux rôles apparemment contradictoires sur les cellules endothéliales selon le contexte, c'est à dire, en présence ou non de facteurs de croissance. Cette situation complexe peut être mise en parallèle avec celui exercé par le TGF- β . En effet, si de nombreuses études ont démontré que la délétion du gène codant pour le TGF- β induit la mort des embryons de souris *in utero* consécutive à des défauts de vascularisation,^{189,193-195} comme cela est également observé dans le cas de la protéine S, la situation est plus complexe *in vitro*. Il semble que l'activité pro- ou anti-angiogénique jouée par le TGF- β dépende fortement du type de récepteur auquel il se lie. La liaison du TGF- β à son récepteur ALK1 induit le recrutement de Smad1/5 stimulant la prolifération, la migration et la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales.^{192,196,197} A contrario, la liaison à son récepteur ALK5 induit le recrutement de Smad2/3 inhibant la prolifération, la migration et la formation du réseau capillaire par les cellules endothéliales.^{190,196,203} L'endostatine peut elle aussi avoir un rôle différent selon son organisation tridimensionnelle. La forme monomérique de l'endostatine a un rôle anti-angiogénique⁵⁹ alors que sa forme trimérique a un rôle pro-angiogénique.^{246,247} Des études suggèrent également que selon le type de protéases impliquées dans la production de la TSP1 à partir de la matrice extracellulaire, celle-ci aurait une activité pro- ou anti-angiogénique.^{249,259} Un grand nombre de facteurs anti-angiogéniques endogènes présente ainsi une double action dépendant du micro-environnement cellulaire.

A ce titre, le microenvironnement tumoral ainsi que les autres types cellulaires composant les vaisseaux sanguins jouent un rôle essentiel lors de l'angiogenèse. Ainsi, la délétion conditionnelle du gène *PROS1* *in vivo* chez la souris dans les cellules musculaires lisses vasculaires, connues pour sécréter la protéine S,⁴⁰⁹ induit des défauts de vascularisation, suggérant que la protéine S régule l'activité des cellules musculaires lisses vasculaires.⁴⁰⁴ L'activation de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires par la protéine S a été démontrée sans que le récepteur impliqué n'ait été identifié.^{427,428,526} La protéine S régule donc l'activité d'autres cellules composant les vaisseaux sanguins. Bien que l'expression des récepteurs TAM dans les péricytes soit avérée,⁵⁸³ aucune étude n'a pour le moment étudié le rôle joué par la protéine S sur ce type cellulaire. Cet aspect est une perspective intéressante pour notre travail étant donné le rôle important que jouent les péricytes dans le système vasculaire.

La protéine S se distingue de son homologue structural Gas6 par la présence d'un site de clivage par les sérines protéases dans sa séquence.^{405,410} La protéine S représente un véritable puzzle dont il serait intéressant de déterminer si tout ou partie aurait un rôle anti-angiogénique. Il serait également intéressant de générer et d'étudier dans notre système de bouchons de Matrigel, le rôle de chacun des fragments de protéine S générés suite au clivage par la thrombine comme cela a été décrit dans une étude précédente.⁵⁸⁴ La protéine S se liant à ses récepteurs TAM par l'intermédiaire de son domaine SHBG,^{408,410} nous suggérons que, s'il subsiste un effet anti-angiogénique, il ne pourrait être supporté que par cette partie de la protéine.

Il serait intéressant d'étudier le rôle physiologique joué par la protéine S lors du développement embryonnaire. En effet, il a été démontré que les individus *PROS*^{-/-} meurent *in utero* à E 17.5.⁴⁰⁴ Cela suggère que le rôle joué par la protéine S avant ce stade de développement embryonnaire n'est pas primordial. Il pourrait exister une expression spatiotemporelle de la protéine S et peut-être, également, de ses récepteurs TAM au cours du développement embryonnaire.

Nous émettons l'hypothèse qu'il existerait un système paracrine entre les cellules vasculaires produisant la protéine S (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses vasculaires)^{404,407,409} et les péricytes exprimant les récepteurs de la protéine S. Ce système permettrait de réguler finement l'activité des péricytes et donc la maturation, le maintien et le fonctionnement des vaisseaux sanguins.

Le système protéine S/Mer pourrait jouer un rôle important au cours de l'angiogenèse tumorale. Des études ont démontré que les cellules de cancer colorectal⁴³⁴ et de carcinome pulmonaire⁴³³ humain sécrètent de la protéine S. En nous basant sur le modèle de sécrétion du récepteur soluble Mer par les cellules tumorales démontré par Png et coll.,⁵²⁵ nous émettons les hypothèses suivantes qu'il serait intéressant d'explorer :

- Les cellules tumorales sécrèteraient de la protéine S lorsque les facteurs pro-angiogéniques sont peu présents afin d'induire la vascularisation de la tumeur en agissant de manière paracrine pour activer les cellules endothéliales voisines.
- La sécrétion de protéine S par les cellules tumorales permettrait de normaliser la vascularisation anarchique de la tumeur en limitant l'angiogenèse induite par les facteurs de croissance afin d'améliorer sa perfusion.

L'activité autocrine de la protéine S sur les cellules tumorales n'est pas à exclure étant donné que les cellules tumorales de divers cancers expriment les récepteurs TAM⁴⁴⁸. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle joué par la protéine S lors de la croissance tumorale.

Bibliographie

Ouvrages

CHABOT, Catherine. *Rôle de la protéine tyrosine phosphatase DEP-1 dans la régulation du programme angiogénique induit par le VEGF* [En ligne]. Thèse de Biologie moléculaire. Faculté de Médecine : Université de Montréal, 2009 [consulté le 3 septembre 2012]
https://papyrus.bib.umontreal.ca/jspui/bitstream/1866/3555/4/Chabot_Catherine_2010_these.pdf

CLARHAUT, Jonathan. *Etude de la régulation de l'expression de la sémaphorine anti-tumorale SEMA3F*. Thèse de Biologie cellulaire et moléculaire. Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées : Université de Poitiers, 2008 [consulté le 15 mars 2012]

DELFORTRIE, Suzanne. *Rôle de la VE-statine (EGFL7) dans la tumorigenèse : repression de l'activation des cellules endothéliales et contribution à l'échappement à l'immunité anti-tumorale* [En ligne]. Thèse de Biologie cellulaire et moléculaire. Université du droit et de la santé : Lille 2, 2011 [consulté le 12 août 2012]
<http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/69/31/57/PDF/Delfortrie-Suzanne.pdf>

DROGAT, Benjamin. *Ischémie et angiogenèse tumorale : effets des carences en glucose et en acides aminés sur l'expression du VEGFA par les cellules tumorales et implication de la réponse UPR (« Unfolded Protein Response »)* [En ligne]. Thèse de Biologie cellulaire et moléculaire. Université de Bordeaux I, 2005 [consulté le 7 mai 2012]
http://grenet.drimm.u-bordeaux1.fr/pdf/2005/DROGAT_BENJAMIN_2005.pdf

FOURCOT, Agnès. *Rôle de la protéine Gas6 et des cellules précurseurs dans la stéatohépatite et la fibrose hépatique* [En ligne]. Thèse de Physiopathologie. Université Paris est, 2010 [consulté le 6 septembre 2012]
<http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/67/68/62/PDF/th2010PEST0040.pdf>

GELY-PERNOT, Aurore. *Implication des protéines vitamine K-dépendantes dans la régulation de l'activité des cellules souches du cerveau et dans la réparation de la lésion rétinienne chez le rongeur adulte* [En ligne]. Thèse de Biologie cellulaire et neurosciences. Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées, 2009 [consulté le 27 juin 2012]
<http://theses.edel.univ-poitiers.fr/theses/2009/Gely-Pernot-Aurore/2009-Gely-Pernot-Aurore-These.pdf>

LAMERANT-FAYEL, Nathalie. *Organo-spécificité de l'endothélium : mise en évidence et caractérisation d'une molécule régulatrice de l'adhérence, nommée ARM-1* [En ligne]. Thèse de Biologie cellulaire et moléculaire. Université d'Orléans, 2004 [consulté le 14 août 2012]
http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/04/83/12/PDF/2004_these_lamerant_fayel.pdf

MANNIC, Tiphanie. *VE-cadhérine dans l'inflammation et le cancer : Phosphorylation et clivage* [En ligne]. Thèse de Biologie cellulaire. Université Joseph Fourier : Grenoble I, 2004 [consulté le 14 août 2012]
http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/52/61/08/PDF/these_finale_15-09.pdf

Bibliographie

PALMER JF, editor. , ed. The works of John Hunter FRS. Vol 1 London: Longman, Rees, Orme, Brown, Green and Longman; 1835.

PLANEL, Séverine. *Développement d'une thérapie anti-angiogène et anti-tumorale utilisant les propriétés de la protéine à doigts de zinc TIS11b* [En ligne]. Thèse de Biologie. Université Joseph Fourier : Grenoble I, 2008 [consulté le 24 août 2012]
http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/34/12/28/PDF/these_sev_planel.pdf

RAYSSAC, Audrey. *Vecteurs multicistroniques pro-angiogéniques : une nouvelle stratégie de thérapie génique de l'ischémie critique des membres inférieurs* [En ligne]. Thèse de Physiopathologie. Université Paul Sabatier : Toulouse III, 2009 [consulté le 27 juillet 2012]
http://thesesups.ups-tlse.fr/660/1/Rayssac_Audrey.pdf

Articles et revues

1. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* 1972;175 (3):409-416.
2. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* 1998;125 (4):725-732.
3. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11 73-91.
4. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003;9 (6):685-693.
5. Risau W. Differentiation of endothelium. *Faseb J.* 1995;9 (10):926-933.
6. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386 (6626):671-674.
7. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature.* 2005;438 (7070):946-953.
8. Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology.* 2005;69 Suppl 3 11-16.
9. Cleaver O, Melton DA. Endothelial signaling during development. *Nat Med.* 2003;9 (6):661-668.
10. Fajardo LF. The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol.* 1989;92 (2):241-250.
11. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 2003;196 (3):430-443.
12. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998;91 (10):3527-3561.
13. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8 (6):464-478.
14. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275 (5302):964-967.
15. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85 (3):221-228.
16. Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lievre F. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development.* 1989;105 (3):473-485.
17. Couffinhal T, Dufourcq P, Daret D, Duplaa C. [The mechanisms of angiogenesis. Medical and therapeutic applications]. *Rev Med Interne.* 2001;22 (11):1064-1082.
18. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6 (4):389-395.
19. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407 (6801):249-257.

Bibliographie

20. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438 (7070):932-936.
21. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995;1 (1):27-31.
22. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9 (6):653-660.
23. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473 (7347):298-307.
24. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277 (5322):55-60.
25. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003;161 (6):1163-1177.
26. Djonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003;314 (1):107-117.
27. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int*. 1999;56 (3):794-814.
28. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008;8 (8):604-617.
29. Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science*. 1994;264 (5158):569-571.
30. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 1995;376 (6535):70-74.
31. Blum Y, Belting HG, Ellertsdottir E, Herwig L, Luders F, Affolter M. Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo. *Dev Biol*. 2008;316 (2):312-322.
32. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn*. 2004;231 (3):474-488.
33. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*. 1971;133 (2):275-288.
34. Duda DG, Cohen KS, Kozin SV, et al. Evidence for incorporation of bone marrow-derived endothelial cells into perfused blood vessels in tumors. *Blood*. 2006;107 (7):2774-2776.
35. Dome B, Hendrix MJ, Paku S, Tovari J, Timar J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*. 2007;170 (1):1-15.
36. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005;307 (5706):58-62.
37. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*. 1999;284 (5422):1994-1998.
38. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*. 1999;155 (3):739-752.
39. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene*. 2003;22 (20):3070-3075.
40. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer*. 2003;3 (6):411-421.
41. Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, et al. Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19 (3):233-246.
42. Seftor EA, Meltzer PS, Schatteman GC, et al. Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;44 (1):17-27.

Bibliographie

43. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*. 2010;468 (7325):829-833.
44. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*. 2010;468 (7325):824-828.
45. Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res*. 2004;64 (11):3731-3736.
46. Jain RK. Transvascular and interstitial transport in tumors. *Adv Exp Med Biol*. 1988;242 215-220.
47. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol*. 2002;160 (3):985-1000.
48. Baluk P, Morikawa S, Haskell A, Mancuso M, McDonald DM. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol*. 2003;163 (5):1801-1815.
49. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*. 2000;156 (4):1363-1380.
50. Red-Horse K, Crawford Y, Shojaei F, Ferrara N. Endothelium-microenvironment interactions in the developing embryo and in the adult. *Dev Cell*. 2007;12 (2):181-194.
51. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285 (21):1182-1186.
52. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3 (6):401-410.
53. Rak J, Yu JL. Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand". *Semin Cancer Biol*. 2004;14 (2):93-104.
54. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8 (8):610-622.
55. Brem S, Brem H, Folkman J, Finkelstein D, Patz A. Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Res*. 1976;36 (8):2807-2812.
56. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*. 1995;1 (2):149-153.
57. Parangi S, O'Reilly M, Christofori G, et al. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93 (5):2002-2007.
58. Miosge N, Sasaki T, Timpl R. Angiogenesis inhibitor endostatin is a distinct component of elastic fibers in vessel walls. *Faseb J*. 1999;13 (13):1743-1750.
59. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res*. 2005;65 (10):3967-3979.
60. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003;314 (1):15-23.
61. Reinmuth N, Liu W, Jung YD, et al. Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. *Faseb J*. 2001;15 (7):1239-1241.
62. Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine*. 2000;12 (1):1-9.
63. Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*. 2001;153 (3):543-553.
64. Kobayashi H, DeBusk LM, Babichev YO, Dumont DJ, Lin PC. Hepatocyte growth factor mediates angiopoietin-induced smooth muscle cell recruitment. *Blood*. 2006;108 (4):1260-1266.

Bibliographie

65. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 1996;87 (7):1171-1180.
66. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25 (4):581-611.
67. Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2004;6 (4):409-421.
68. Dong J, Grunstein J, Tejada M, et al. VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *Embo J*. 2004;23 (14):2800-2810.
69. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121 (3):335-348.
70. St Croix B, Rago C, Velculescu V, et al. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science*. 2000;289 (5482):1197-1202.
71. Bandyopadhyay S, Zhan R, Chaudhuri A, et al. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat Med*. 2006;12 (8):933-938.
72. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109 (3):227-241.
73. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219 (4587):983-985.
74. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;161 (2):851-858.
75. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*. 2002;2 (10):795-803.
76. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9 (6):669-676.
77. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *Embo J*. 1989;8 (12):3801-3806.
78. Woolard J, Bevan HS, Harper SJ, Bates DO. Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. *Microcirculation*. 2009;16 (7):572-592.
79. Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol*. 2005;6 (2):209.
80. Neufeld G, Cohen T, Gitay-Goren H, et al. Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants. *Cancer Metastasis Rev*. 1996;15 (2):153-158.
81. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991;266 (18):11947-11954.
82. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7 (5):359-371.
83. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*. 2006;312 (5):549-560.
84. Gu C, Limberg BJ, Whitaker GB, et al. Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem*. 2002;277 (20):18069-18076.

Bibliographie

85. Fuh G, Garcia KC, de Vos AM. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem.* 2000;275 (35):26690-26695.
86. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol.* 1999;10 (6):528-535.
87. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res.* 2000;86 (2):E29-35.
88. Mould AW, Greco SA, Cahill MM, et al. Transgenic overexpression of vascular endothelial growth factor-B isoforms by endothelial cells potentiates postnatal vessel growth in vivo and in vitro. *Circ Res.* 2005;97 (6):e60-70.
89. Lohela M, Saaristo A, Veikkola T, Alitalo K. Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemost.* 2003;90 (2):167-184.
90. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med.* 2001;7 (2):186-191.
91. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science.* 1997;276 (5317):1423-1425.
92. Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *Embo J.* 2001;20 (17):4762-4773.
93. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* 2004;5 (1):74-80.
94. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J.* 1996;15 (2):290-298.
95. Baldwin ME, Roufail S, Halford MM, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG. Multiple forms of mouse vascular endothelial growth factor-D are generated by RNA splicing and proteolysis. *J Biol Chem.* 2001;276 (47):44307-44314.
96. Kiba A, Sagara H, Hara T, Shibuya M. VEGFR-2-specific ligand VEGF-E induces non-edematous hyper-vascularization in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;301 (2):371-377.
97. Junqueira de Azevedo IL, Farsky SH, Oliveira ML, Ho PL. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. *J Biol Chem.* 2001;276 (43):39836-39842.
98. Komori Y, Nikai T, Taniguchi K, Masuda K, Sugihara H. Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper). *Biochemistry.* 1999;38 (36):11796-11803.
99. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88 (20):9267-9271.
100. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001;7 (5):575-583.
101. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 1994;269 (41):25646-25654.
102. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J.* 1999;13 (1):9-22.

103. Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L. Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;237 59-83.
104. Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, et al. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell*. 2002;1 (1):99-108.
105. Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest*. 1996;98 (11):2507-2511.
106. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer*. 2008;8 (11):880-887.
107. Pages G, Pouyssegur J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc Res*. 2005;65 (3):564-573.
108. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*. 1991;5 (12):1806-1814.
109. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*. 2008;358 (19):2039-2049.
110. Akiri G, Nahari D, Finkelstein Y, Le SY, Elroy-Stein O, Levi BZ. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene*. 1998;17 (2):227-236.
111. Yen L, Benlimame N, Nie ZR, et al. Differential regulation of tumor angiogenesis by distinct ErbB homo- and heterodimers. *Mol Biol Cell*. 2002;13 (11):4029-4044.
112. Lu M, Amano S, Miyamoto K, et al. Insulin-induced vascular endothelial growth factor expression in retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40 (13):3281-3286.
113. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem*. 1996;271 (46):29483-29488.
114. Zhang YW, Su Y, Volpert OV, Vande Woude GF. Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100 (22):12718-12723.
115. Finkenzeller G, Marme D, Weich HA, Hug H. Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C. *Cancer Res*. 1992;52 (17):4821-4823.
116. Deroanne CF, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, Nusgens BV, Lapiere CM. Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res*. 1997;57 (24):5590-5597.
117. Hilmi C, Guyot M, Pages G. VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy. *J Nucleic Acids*. 2012;2012 162692.
118. Koeller DM, Casey JL, Hentze MW, et al. A cytosolic protein binds to structural elements within the iron regulatory region of the transferrin receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86 (10):3574-3578.
119. Ciais D, Cherradi N, Bailly S, et al. Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b. *Oncogene*. 2004;23 (53):8673-8680.
120. Cherradi N, Lejczak C, Desroches-Castan A, Feige JJ. Antagonistic functions of tetradecanoyl phorbol acetate-inducible-sequence 11b and HuR in the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid stability by adrenocorticotropin. *Mol Endocrinol*. 2006;20 (4):916-930.
121. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18 (1):4-25.

122. Huez I, Bornes S, Bresson D, Creancier L, Prats H. New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol Endocrinol*. 2001;15 (12):2197-2210.
123. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995;376 (6535):66-70.
124. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996;87 (8):3336-3343.
125. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*. 2001;7 (11):1194-1201.
126. Ito N, Huang K, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptor-1 wild type and mutant proteins. *Cell Signal*. 2001;13 (11):849-854.
127. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*. 2003;28 (9):488-494.
128. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376 (6535):62-66.
129. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res*. 1995;55 (23):5687-5692.
130. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*. 2001;2001 (112):re21.
131. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1994;269 (43):26988-26995.
132. Dougher M, Terman BI. Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene*. 1999;18 (8):1619-1627.
133. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*. 2007;19 (10):2003-2012.
134. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*. 1999;18 (13):2221-2230.
135. Grazia Lampugnani M, Zanetti A, Corada M, et al. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol*. 2003;161 (4):793-804.
136. Zeng H, Sanyal S, Mukhopadhyay D. Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-induced endothelium migration and proliferation, respectively. *J Biol Chem*. 2001;276 (35):32714-32719.
137. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*. 1998;273 (46):30336-30343.
138. Dayanir V, Meyer RD, Lashkari K, Rahimi N. Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation. *J Biol Chem*. 2001;276 (21):17686-17692.

139. Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, et al. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem.* 2004;279 (21):22267-22275.
140. Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272 (24):15442-15451.
141. Le Boeuf F, Houle F, Huot J. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *J Biol Chem.* 2004;279 (37):39175-39185.
142. Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, et al. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *Embo J.* 2005;24 (13):2342-2353.
143. Lamallice L, Houle F, Jourdan G, Huot J. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene.* 2004;23 (2):434-445.
144. Blanes MG, Oubaha M, Rautureau Y, Gratton JP. Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *J Biol Chem.* 2007;282 (14):10660-10669.
145. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci.* 2008;121 (Pt 13):2115-2122.
146. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.* 1998;111 (Pt 13) 1853-1865.
147. Gavard J. Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Lett.* 2009;583 (1):1-6.
148. Lilien J, Balsamo J. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17 (5):459-465.
149. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16 (2):159-178.
150. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell.* 1999;4 (6):915-924.
151. Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, et al. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res.* 2005;96 (3):384-391.
152. Weis S, Shintani S, Weber A, et al. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2004;113 (6):885-894.
153. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001;2 (3):REVIEWS3005.
154. Murakami M, Nguyen LT, Zhuang ZW, et al. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest.* 2008;118 (10):3355-3366.
155. Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn.* 2001;220 (1):1-17.
156. Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95 (10):5672-5677.
157. Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16 (2):179-186.

158. Bottcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev.* 2005;26 (1):63-77.
159. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16 (2):139-149.
160. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22 (4):201-207.
161. Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciag T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol.* 1985;101 (6):2330-2334.
162. Stokes CL, Rupnick MA, Williams SK, Lauffenburger DA. Chemotaxis of human microvessel endothelial cells in response to acidic fibroblast growth factor. *Lab Invest.* 1990;63 (5):657-668.
163. Presta M, Tiberio L, Rusnati M, Dell'Era P, Ragnotti G. Basic fibroblast growth factor requires a long-lasting activation of protein kinase C to induce cell proliferation in transformed fetal bovine aortic endothelial cells. *Cell Regul.* 1991;2 (9):719-726.
164. Shono T, Kanetake H, Kanda S. The role of mitogen-activated protein kinase activation within focal adhesions in chemotaxis toward FGF-2 by murine brain capillary endothelial cells. *Exp Cell Res.* 2001;264 (2):275-283.
165. Klein S, Giancotti FG, Presta M, Albelda SM, Buck CA, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell.* 1993;4 (10):973-982.
166. Sepp NT, Li LJ, Lee KH, et al. Basic fibroblast growth factor increases expression of the alpha v beta 3 integrin complex on human microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol.* 1994;103 (3):295-299.
167. Underwood PA, Bean PA, Gamble JR. Rate of endothelial expansion is controlled by cell:cell adhesion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34 (1):55-69.
168. Zhou L, Dosanjh A, Chen H, Karasek M. Divergent effects of extracellular oxygen on the growth, morphology, and function of human skin microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2000;182 (1):134-140.
169. Kumar R, Yoneda J, Bucana CD, Fidler IJ. Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int J Oncol.* 1998;12 (4):749-757.
170. Kanda S, Miyata Y, Kanetake H. Fibroblast growth factor-2-mediated capillary morphogenesis of endothelial cells requires signals via Flt-1/vascular endothelial growth factor receptor-1: possible involvement of c-Akt. *J Biol Chem.* 2004;279 (6):4007-4016.
171. Tille JC, Wood J, Mandriota SJ, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;299 (3):1073-1085.
172. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol.* 1998;141 (7):1659-1673.
173. Gabler C, Plath-Gabler A, Killian GJ, Berisha B, Schams D. Expression pattern of fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) system members in bovine corpus luteum endothelial cells during treatment with FGF-2, VEGF or oestradiol. *Reprod Domest Anim.* 2004;39 (5):321-327.
174. Zhang J, Cao R, Zhang Y, Jia T, Cao Y, Wahlberg E. Differential roles of PDGFR-alpha and PDGFR-beta in angiogenesis and vessel stability. *Faseb J.* 2009;23 (1):153-163.
175. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev.* 1997;18 (1):26-45.

Bibliographie

176. Gualandris A, Rusnati M, Belleri M, et al. Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. *Cell Growth Differ.* 1996;7 (2):147-160.
177. Westermark B, Heldin CH. Structure and function of platelet-derived growth factor. *Acta Med Scand Suppl.* 1987;715 19-23.
178. Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest.* 2003;112 (8):1142-1151.
179. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med.* 2003;9 (5):604-613.
180. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997;277 (5323):242-245.
181. Lindahl P, Hellstrom M, Kalen M, et al. Paracrine PDGF-B/PDGF-Rbeta signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli. *Development.* 1998;125 (17):3313-3322.
182. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 1994;8 (16):1888-1896.
183. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: more questions than answers. *Lymphology.* 2000;33 (4):144-147.
184. Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-b receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13 (7):301-307.
185. Ouyang S, He F. Phylogeny of a growth hormone-like cytokine superfamily based upon 3D structure. *J Mol Evol.* 2003;56 (2):131-136.
186. ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8 (11):857-869.
187. Holderfield MT, Hughes CC. Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis. *Circ Res.* 2008;102 (6):637-652.
188. Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* 2009;19 (1):116-127.
189. Oh SP, Seki T, Goss KA, et al. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97 (6):2626-2631.
190. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J.* 2002;21 (7):1743-1753.
191. Roelen BA, van Rooijen MA, Mummery CL. Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev Dyn.* 1997;209 (4):418-430.
192. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8 (1):21-43.
193. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development.* 1995;121 (6):1845-1854.
194. Goumans MJ, Mummery C. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol.* 2000;44 (3):253-265.

195. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83 (12):4167-4171.
196. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, et al. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell*. 2003;12 (4):817-828.
197. Azhar M, Schultz Jel J, Grupp I, et al. Transforming growth factor beta in cardiovascular development and function. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14 (5):391-407.
198. Suarez Y, Sessa WC. MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ Res*. 2009;104 (4):442-454.
199. Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH. Vascular cell apoptosis: cell type-specific modulation by transforming growth factor-beta1 in endothelial cells versus smooth muscle cells. *Circulation*. 1999;99 (15):2019-2026.
200. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbi A, Attisano L, Bernabeu C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem*. 2001;276 (42):38527-38535.
201. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation*. 1994;90 (2):649-652.
202. Taylor LM, Khachigian LM. Induction of platelet-derived growth factor B-chain expression by transforming growth factor-beta involves transactivation by Smads. *J Biol Chem*. 2000;275 (22):16709-16716.
203. Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol*. 1990;111 (2):743-755.
204. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:331-367.
205. Frater-Schroder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Bohlen P. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84 (15):5277-5281.
206. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*. 1987;329 (6140):630-632.
207. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, et al. Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol*. 1996;132 (6):1177-1188.
208. Guo DQ, Wu LW, Dunbar JD, et al. Tumor necrosis factor employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*. 2000;275 (15):11216-11221.
209. Patterson C, Perrella MA, Endege WO, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E. Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1996;98 (2):490-496.
210. Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol*. 1992;140 (3):539-544.
211. Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis. *J Exp Med*. 1994;180 (1):377-382.

Bibliographie

212. Yoshida S, Ono M, Shono T, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol*. 1997;17 (7):4015-4023.
213. Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, Maini RN. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1998;41 (7):1258-1265.
214. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431 (7006):350-355.
215. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116 (2):281-297.
216. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23 175-205.
217. Chang TC, Mendell JT. microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2007;8 215-239.
218. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9 (2):102-114.
219. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008;36 (Database issue):D154-158.
220. Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem*. 2005;280 (10):9330-9335.
221. Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res*. 2007;101 (1):59-68.
222. Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res*. 2007;100 (8):1164-1173.
223. Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, et al. Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105 (37):14082-14087.
224. Shilo S, Roy S, Khanna S, Sen CK. Evidence for the involvement of miRNA in redox regulated angiogenic response of human microvascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28 (3):471-477.
225. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*. 2006;108 (9):3068-3071.
226. Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol*. 2003;13 (2):159-167.
227. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86 (3):353-364.
228. Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest*. 1999;103 (2):157-158.
229. Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33 (4):357-369.
230. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997;88 (2):277-285.
231. Yin G, Liu W, An P, et al. Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. *Mol Ther*. 2002;5 (5 Pt 1):547-554.
232. Dixelius J, Cross M, Matsumoto T, Sasaki T, Timpl R, Claesson-Welsh L. Endostatin regulates endothelial cell adhesion and cytoskeletal organization. *Cancer Res*. 2002;62 (7):1944-1947.
233. Hanai J, Dhanabal M, Karumanchi SA, et al. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem*. 2002;277 (19):16464-16469.
234. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274 (17):11721-11726.

235. Kim YM, Hwang S, Kim YM, et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem.* 2002;277 (31):27872-27879.
236. Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *Faseb J.* 2001;15 (6):1044-1053.
237. Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zeisberg M, Kalluri R. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100 (8):4766-4771.
238. Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR, Timpl R. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *Embo J.* 1998;17 (6):1656-1664.
239. Karumanchi SA, Jha V, Ramchandran R, et al. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol Cell.* 2001;7 (4):811-822.
240. Sasaki T, Larsson H, Kreuger J, et al. Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *Embo J.* 1999;18 (22):6240-6248.
241. Kim YM, Jang JW, Lee OH, et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res.* 2000;60 (19):5410-5413.
242. Lee SJ, Jang JW, Kim YM, et al. Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2. *FEBS Lett.* 2002;519 (1-3):147-152.
243. Nyberg P, Heikkilä P, Sorsa T, et al. Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloproteinase-2, -9, and -13. *J Biol Chem.* 2003;278 (25):22404-22411.
244. Wickström SA, Veikkola T, Rehn M, Pihlajaniemi T, Alitalo K, Keski-Oja J. Endostatin-induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cells. *Cancer Res.* 2001;61 (17):6511-6516.
245. Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaisse J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett.* 2000;486 (3):247-251.
246. Ackley BD, Crew JR, Elamäa H, Pihlajaniemi T, Kuo CJ, Kramer JM. The NC1/endostatin domain of *Caenorhabditis elegans* type XVIII collagen affects cell migration and axon guidance. *J Cell Biol.* 2001;152 (6):1219-1232.
247. Kuo CJ, LaMontagne KR, Jr., Garcia-Cardena G, et al. Oligomerization-dependent regulation of motility and morphogenesis by the collagen XVIII NC1/endostatin domain. *J Cell Biol.* 2001;152 (6):1233-1246.
248. Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol.* 2000;19 (7):597-614.
249. Iruela-Arispe ML, Luque A, Lee N. Thrombospondin modules and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36 (6):1070-1078.
250. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, et al. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87 (17):6624-6628.
251. Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Krutzsch HC, Lawler J, Roberts DD. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation.* 1999;100 (13):1423-1431.
252. Lawler J, Miao WM, Duquette M, Bouck N, Bronson RT, Hynes RO. Thrombospondin-1 gene expression affects survival and tumor spectrum of p53-deficient mice. *Am J Pathol.* 2001;159 (5):1949-1956.
253. Rodríguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of

- matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98 (22):12485-12490.
254. Shafiee A, Penn JS, Kruttsch HC, Inman JK, Roberts DD, Blake DA. Inhibition of retinal angiogenesis by peptides derived from thrombospondin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41 (8):2378-2388.
255. Stellmach V, Volpert OV, Crawford SE, Lawler J, Hynes RO, Bouck N. Tumour suppressor genes and angiogenesis: the role of TP53 in fibroblasts. *Eur J Cancer*. 1996;32A (14):2394-2400.
256. Streit M, Velasco P, Brown LF, et al. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol*. 1999;155 (2):441-452.
257. Zabrenetzky V, Harris CC, Steeg PS, Roberts DD. Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression in melanoma, lung and breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 1994;59 (2):191-195.
258. Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med*. 2002;8 (4):349-357.
259. Agah A, Kyriakides TR, Lawler J, Bornstein P. The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice. *Am J Pathol*. 2002;161 (3):831-839.
260. Noh YH, Matsuda K, Hong YK, et al. An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration in vitro and tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Invest Dermatol*. 2003;121 (6):1536-1543.
261. Bouck N. PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med*. 2002;8 (7):330-334.
262. Duh EJ, Yang HS, Haller JA, et al. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor: implications for ocular angiogenesis. *Am J Ophthalmol*. 2004;137 (4):668-674.
263. Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Matsumura M. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2002;134 (3):348-353.
264. Ogata N, Wang L, Jo N, et al. Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res*. 2001;22 (4):245-252.
265. Ogata N, Wada M, Otsuji T, Jo N, Tombran-Tink J, Matsumura M. Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43 (4):1168-1175.
266. Guan M, Pang CP, Yam HF, Cheung KF, Liu WW, Lu Y. Inhibition of glioma invasion by overexpression of pigment epithelium-derived factor. *Cancer Gene Ther*. 2004;11 (5):325-332.
267. Abe R, Shimizu T, Yamagishi S, et al. Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo. *Am J Pathol*. 2004;164 (4):1225-1232.
268. Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, et al. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol*. 2001;189 (3):323-333.
269. Ohno-Matsui K, Yoshida T, Uetama T, Mochizuki M, Morita I. Vascular endothelial growth factor upregulates pigment epithelium-derived factor expression via VEGFR-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303 (3):962-967.

Bibliographie

270. Cozzolino F, Torcia M, Aldinucci D, et al. Interleukin 1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87 (17):6487-6491.
271. Volpert OV, Fong T, Koch AE, et al. Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med*. 1998;188 (6):1039-1046.
272. Cao R, Farnebo J, Kurimoto M, Cao Y. Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *Faseb J*. 1999;13 (15):2195-2202.
273. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, et al. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol*. 1998;161 (12):6845-6852.
274. Patterson BC, Sang QA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem*. 1997;272 (46):28823-28825.
275. Sang QX. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res*. 1998;8 (3):171-177.
276. Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1997;88 (6):801-810.
277. Lijnen HR, Ugwu F, Bini A, Collen D. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry*. 1998;37 (14):4699-4702.
278. O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J, Moses MA. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem*. 1999;274 (41):29568-29571.
279. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994;79 (2):315-328.
280. Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, et al. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95 (10):5579-5583.
281. Kowanzetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res*. 2006;12 (17):5018-5022.
282. Moser TL, Stack MS, Asplin I, et al. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96 (6):2811-2816.
283. Tarui T, Majumdar M, Miles LA, Ruf W, Takada Y. Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin. *J Biol Chem*. 2002;277 (37):33564-33570.
284. Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW, Brown NJ. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Mol Pathol*. 2002;55 (5):300-304.
285. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477 (1-2):267-283.
286. Seo DW, Li H, Guedez L, et al. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell*. 2003;114 (2):171-180.
287. Seo DW, Li H, Qu CK, et al. Shp-1 mediates the antiproliferative activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2006;281 (6):3711-3721.
288. Lee SJ, Tsang PS, Diaz TM, Wei BY, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 modulates VEGFR-2 phosphorylation and enhances phosphodiesterase activity in endothelial cells. *Lab Invest*. 2010;90 (3):374-382.
289. Seo DW, Kim SH, Eom SH, et al. TIMP-2 disrupts FGF-2-induced downstream signaling pathways. *Microvasc Res*. 2008;76 (3):145-151.

290. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3 (5):391-400.
291. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350 (23):2335-2342.
292. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006;355 (24):2542-2550.
293. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2007;357 (26):2666-2676.
294. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, Giust MJ. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2006;113 (3):363-372 e365.
295. Spaide RF, Laud K, Fine HF, et al. Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina.* 2006;26 (4):383-390.
296. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7 (11):833-846.
297. Iturralde D, Spaide RF, Meyerle CB, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short-term study. *Retina.* 2006;26 (3):279-284.
298. Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina.* 2006;26 (3):275-278.
299. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw.* 2009;20 (4):158-163.
300. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006;3 (1):24-40.
301. Smith JK, Mamoon NM, Duhe RJ. Emerging roles of targeted small molecule protein-tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Oncol Res.* 2004;14 (4-5):175-225.
302. Lang L. FDA approves sorafenib for patients with inoperable liver cancer. *Gastroenterology.* 2008;134 (2):379.
303. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356 (2):125-134.
304. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356 (2):115-124.
305. Eskens FA, Verweij J. The clinical toxicity profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) targeting angiogenesis inhibitors; a review. *Eur J Cancer.* 2006;42 (18):3127-3139.
306. Verheul HM, Pinedo HM. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat Rev Cancer.* 2007;7 (6):475-485.
307. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell.* 2007;131 (3):463-475.
308. Alonso A, Sasin J, Bottini N, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell.* 2004;117 (6):699-711.
309. Andersen JN, Mortensen OH, Peters GH, et al. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol.* 2001;21 (21):7117-7136.
310. Jia Z, Barford D, Flint AJ, Tonks NK. Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science.* 1995;268 (5218):1754-1758.

311. Andersen JN, Jansen PG, Echwald SM, et al. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *Faseb J*. 2004;18 (1):8-30.
312. Garton AJ, Burnham MR, Bouton AH, Tonks NK. Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130cas; a novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition. *Oncogene*. 1997;15 (8):877-885.
313. Mattila E, Auvinen K, Salmi M, Ivaska J. The protein tyrosine phosphatase TCPTP controls VEGFR2 signalling. *J Cell Sci*. 2008;121 (Pt 21):3570-3580.
314. Mellberg S, Dimberg A, Bahram F, et al. Transcriptional profiling reveals a critical role for tyrosine phosphatase VE-PTP in regulation of VEGFR2 activity and endothelial cell morphogenesis. *Faseb J*. 2009;23 (5):1490-1502.
315. Winderlich M, Keller L, Cagna G, et al. VE-PTP controls blood vessel development by balancing Tie-2 activity. *J Cell Biol*. 2009;185 (4):657-671.
316. Dominguez MG, Hughes VC, Pan L, et al. Vascular endothelial tyrosine phosphatase (VE-PTP)-null mice undergo vasculogenesis but die embryonically because of defects in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104 (9):3243-3248.
317. Nakamura Y, Patrushev N, Inomata H, et al. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell-cell adhesions in endothelial cells. *Circ Res*. 2008;102 (10):1182-1191.
318. Nakagami H, Cui TX, Iwai M, et al. Tumor necrosis factor- α inhibits growth factor-mediated cell proliferation through SHP-1 activation in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22 (2):238-242.
319. Bhattacharya R, Kwon J, Wang E, Mukherjee P, Mukhopadhyay D. Src homology 2 (SH2) domain containing protein tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) dephosphorylates VEGF Receptor-2 and attenuates endothelial DNA synthesis, but not migration*. *J Mol Signal*. 2008;3 8.
320. Mitola S, Brenchio B, Piccinini M, et al. Type I collagen limits VEGFR-2 signaling by a SHP2 protein-tyrosine phosphatase-dependent mechanism 1. *Circ Res*. 2006;98 (1):45-54.
321. Sinha S, Vohra PK, Bhattacharya R, Dutta S, Sinha S, Mukhopadhyay D. Dopamine regulates phosphorylation of VEGF receptor 2 by engaging Src-homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2. *J Cell Sci*. 2009;122 (Pt 18):3385-3392.
322. Gallicchio M, Mitola S, Valdembri D, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor. *Blood*. 2005;105 (5):1970-1976.
323. Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*. 2003;28 (6):284-293.
324. Wang W, Liu L, Song X, et al. Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation. *J Cell Biochem*. 2011;112 (8):2062-2071.
325. Feng GS. Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. *Exp Cell Res*. 1999;253 (1):47-54.
326. Yang J, Liang X, Niu T, Meng W, Zhao Z, Zhou GW. Crystal structure of the catalytic domain of protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem*. 1998;273 (43):28199-28207.
327. Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell*. 1998;92 (4):441-450.
328. Mannell H, Krotz F. SHP-2 regulates growth factor dependent vascular signalling and function. *Mini Rev Med Chem*. 2012.
329. Qu CK. Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1592 (3):297-301.
330. Grossmann KS, Rosario M, Birchmeier C, Birchmeier W. The tyrosine phosphatase Shp2 in development and cancer. *Adv Cancer Res*. 2010;106 53-89.

331. Bonini JA, Colca J, Hofmann C. Altered expression of insulin signaling components in streptozotocin-treated rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;212 (3):933-938.
332. Lorenz U, Ravichandran KS, Pei D, Walsh CT, Burakoff SJ, Neel BG. Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T cells. *Mol Cell Biol.* 1994;14 (3):1824-1834.
333. Bennett AM, Tang TL, Sugimoto S, Walsh CT, Neel BG. Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91 (15):7335-7339.
334. Lorenz U. SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels. *Immunol Rev.* 2009;228 (1):342-359.
335. Lu W, Gong D, Bar-Sagi D, Cole PA. Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling. *Mol Cell.* 2001;8 (4):759-769.
336. Bialy L, Waldmann H. Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: next-generation drugs? *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005;44 (25):3814-3839.
337. Chong ZZ, Maiese K. The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol Histopathol.* 2007;22 (11):1251-1267.
338. Feng GS, Shen R, Heng HH, Tsui LC, Kazlauskas A, Pawson T. Receptor-binding, tyrosine phosphorylation and chromosome localization of the mouse SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *Oncogene.* 1994;9 (6):1545-1550.
339. Yamauchi K, Milarski KL, Saltiel AR, Pessin JE. Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92 (3):664-668.
340. You M, Zhao Z. Positive effects of SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 on epidermal growth factor- and interferon-gamma-stimulated activation of STAT transcription factors in HeLa cells. *J Biol Chem.* 1997;272 (37):23376-23381.
341. Yi T, Mui AL, Krystal G, Ihle JN. Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol Cell Biol.* 1993;13 (12):7577-7586.
342. Pani G, Kozlowski M, Cambier JC, Mills GB, Siminovitch KA. Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling. *J Exp Med.* 1995;181 (6):2077-2084.
343. Kim CH, Qu CK, Hangoc G, et al. Abnormal chemokine-induced responses of immature and mature hematopoietic cells from motheaten mice implicate the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in chemokine responses. *J Exp Med.* 1999;190 (5):681-690.
344. Kroll J, Waltenberger J. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272 (51):32521-32527.
345. Sugano M, Tsuchida K, Maeda T, Makino N. SiRNA targeting SHP-1 accelerates angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia. *Atherosclerosis.* 2007;191 (1):33-39.
346. Matthews RJ, Bowne DB, Flores E, Thomas ML. Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. *Mol Cell Biol.* 1992;12 (5):2396-2405.
347. Plutzky J, Neel BG, Rosenberg RD. Isolation of a src homology 2-containing tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89 (3):1123-1127.
348. Shen SH, Bastien L, Posner BI, Chretien P. A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature.* 1991;352 (6337):736-739.

Bibliographie

349. Yi TL, Cleveland JL, Ihle JN. Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol Cell Biol.* 1992;12 (2):836-846.
350. Uchida T, Matozaki T, Noguchi T, et al. Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains. *J Biol Chem.* 1994;269 (16):12220-12228.
351. Yoshida K, Kharbanda S, Kufe D. Functional interaction between SHPTP1 and the Lyn tyrosine kinase in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem.* 1999;274 (49):34663-34668.
352. Jin YJ, Yu CL, Burakoff SJ. Human 70-kDa SHP-1L differs from 68-kDa SHP-1 in its C-terminal structure and catalytic activity. *J Biol Chem.* 1999;274 (40):28301-28307.
353. Frank C, Burkhardt C, Imhof D, et al. Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1. *J Biol Chem.* 2004;279 (12):11375-11383.
354. Lodeiro M, Alen BO, Mosteiro CS, et al. The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates Akt signaling in the ghrelin/GHSR1a system. *Mol Biol Cell.* 2011;22 (21):4182-4191.
355. Tsui FW, Martin A, Wang J, Tsui HW. Investigations into the regulation and function of the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase, SHP-1. *Immunol Res.* 2006;35 (1-2):127-136.
356. Shultz LD, Sidman CL. Genetically determined murine models of immunodeficiency. *Annu Rev Immunol.* 1987;5 367-403.
357. Neel BG, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9 (2):193-204.
358. Zhang J, Somani AK, Siminovitch KA. Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin Immunol.* 2000;12 (4):361-378.
359. Barford D, Neel BG. Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure.* 1998;6 (3):249-254.
360. Markova B, Herrlich P, Ronnstrand L, Bohmer FD. Identification of protein tyrosine phosphatases associating with the PDGF receptor. *Biochemistry.* 2003;42 (9):2691-2699.
361. Tang TL, Freeman RM, Jr., O'Reilly AM, Neel BG, Sokol SY. The SH2-containing protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 is required upstream of MAP kinase for early Xenopus development. *Cell.* 1995;80 (3):473-483.
362. Freeman RM, Jr., Plutzky J, Neel BG. Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of Drosophila corkscrew. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89 (23):11239-11243.
363. Saxton TM, Henkemeyer M, Gasca S, et al. Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2. *Embo J.* 1997;16 (9):2352-2364.
364. Ekman S, Kallin A, Engstrom U, Heldin CH, Ronnstrand L. SHP-2 is involved in heterodimer specific loss of phosphorylation of Tyr771 in the PDGF beta-receptor. *Oncogene.* 2002;21 (12):1870-1875.
365. Zhang SQ, Yang W, Kontaridis MI, et al. Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell.* 2004;13 (3):341-355.
366. Chen Y, Wen R, Yang S, et al. Identification of Shp-2 as a Stat5A phosphatase. *J Biol Chem.* 2003;278 (19):16520-16527.
367. Wu TR, Hong YK, Wang XD, et al. SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem.* 2002;277 (49):47572-47580.
368. Ali S, Nouhi Z, Chughtai N, Ali S. SHP-2 regulates SOCS-1-mediated Janus kinase-2 ubiquitination/degradation downstream of the prolactin receptor. *J Biol Chem.* 2003;278 (52):52021-52031.

369. Oh ES, Gu H, Saxton TM, et al. Regulation of early events in integrin signaling by protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Mol Cell Biol.* 1999;19 (4):3205-3215.
370. You M, Flick LM, Yu D, Feng GS. Modulation of the nuclear factor kappa B pathway by Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating the induction of interleukin (IL)-6 by IL-1 or tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 2001;193 (1):101-110.
371. Van Vactor D, O'Reilly AM, Neel BG. Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8 (1):112-126.
372. Saxton TM, Pawson T. Morphogenetic movements at gastrulation require the SH2 tyrosine phosphatase Shp2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96 (7):3790-3795.
373. Saxton TM, Ciruna BG, Holmyard D, et al. The SH2 tyrosine phosphatase shp2 is required for mammalian limb development. *Nat Genet.* 2000;24 (4):420-423.
374. Mannell H, Hellwig N, Gloe T, et al. Inhibition of the tyrosine phosphatase SHP-2 suppresses angiogenesis in vitro and in vivo. *J Vasc Res.* 2008;45 (2):153-163.
375. Stenflo J, Fernlund P, Egan W, Roepstorff P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71 (7):2730-2733.
376. Di Scipio RG, Hermodson MA, Yates SG, Davie EW. A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry.* 1977;16 (4):698-706.
377. Walker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J Biol Chem.* 1980;255 (12):5521-5524.
378. Shen L, Dahlback B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem.* 1994;269 (29):18735-18738.
379. Dahlback B, Stenflo J. High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78 (4):2512-2516.
380. Dahlback B. Inhibition of protein Ca cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J Biol Chem.* 1986;261 (26):12022-12027.
381. Griffin JH, Gruber A, Fernandez JA. Reevaluation of total, free, and bound protein S and C4b-binding protein levels in plasma anticoagulated with citrate or hirudin. *Blood.* 1992;79 (12):3203-3211.
382. Denis CV, Roberts SJ, Hackeng TM, Lenting PJ. In vivo clearance of human protein S in a mouse model: influence of C4b-binding protein and the Heerlen polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25 (10):2209-2215.
383. Dahlback B. Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K-dependent protein S. *Biochem J.* 1983;209 (3):847-856.
384. Dahlback B, Frohm B, Nelsestuen G. High affinity interaction between C4b-binding protein and vitamin K-dependent protein S in the presence of calcium. Suggestion of a third component in blood regulating the interaction. *J Biol Chem.* 1990;265 (27):16082-16087.
385. Hillarp A, Dahlback B. Novel subunit in C4b-binding protein required for protein S binding. *J Biol Chem.* 1988;263 (25):12759-12764.
386. Nelson RM, Long GL. Solution-phase equilibrium binding interaction of human protein S with C4b-binding protein. *Biochemistry.* 1991;30 (9):2384-2390.
387. Mosnier LO, Griffin JH. Protein C anticoagulant activity in relation to anti-inflammatory and anti-apoptotic activities. *Front Biosci.* 2006;11 2381-2399.
388. Rodriguez de Cordoba S, Perez-Blas M, Ramos-Ruiz R, Sanchez-Corral P, Pardo-Manuel de Villena F, Rey-Campos J. The gene coding for the beta-chain of C4b-binding protein (C4BPB) has become a pseudogene in the mouse. *Genomics.* 1994;21 (3):501-509.
389. Garcia de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 2007;98 (3):543-556.

Bibliographie

390. Garcia de Frutos P, Dahlback B. cDNA structure of rabbit C4b-binding protein alpha-chain. Preserved sequence motive in complement regulatory protein modules which bind C4b. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1261 (2):285-289.
391. Hillarp A, Thern A, Dahlback B. Bovine C4b binding protein. Molecular cloning of the alpha- and beta-chains provides structural background for lack of complex formation with protein S. *J Immunol*. 1994;153 (9):4190-4199.
392. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003;124 (3 Suppl):26S-32S.
393. Hackeng TM, van 't Veer C, Meijers JC, Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *J Biol Chem*. 1994;269 (33):21051-21058.
394. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem*. 1993;268 (4):2872-2877.
395. Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH. Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91 (7):2728-2732.
396. Koppelman SJ, van't Veer C, Sixma JJ, Bouma BN. Synergistic inhibition of the intrinsic factor X activation by protein S and C4b-binding protein. *Blood*. 1995;86 (7):2653-2660.
397. Hackeng TM, Sere KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103 (9):3106-3111.
398. Castoldi E, Hackeng TM. Regulation of coagulation by protein S. *Curr Opin Hematol*. 2008;15 (5):529-536.
399. Heeb MJ, Marzec U, Gruber A, Hanson SR. Antithrombotic activity of protein S infused without activated protein C in a baboon thrombosis model. *Thromb Haemost*. 2012;107 (4):690-698.
400. Saller F, Brisset AC, Tchaikovski SN, et al. Generation and phenotypic analysis of protein S-deficient mice. *Blood*. 2009;114 (11):2307-2314.
401. Franco RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet*. 2001;109 (4):369-384.
402. D'Angelo A, Vigano D'Angelo S. Protein S deficiency. *Haematologica*. 2008;93 (4):498-501.
403. Gandrille S, Borgel D, Sala N, et al. Protein S deficiency: a database of mutations--summary of the first update. *Thromb Haemost*. 2000;84 (5):918.
404. Burstyn-Cohen T, Heeb MJ, Lemke G. Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *J Clin Invest*. 2009;119 (10):2942-2953.
405. Dahlback B. The tale of protein S and C4b-binding protein, a story of affection. *Thromb Haemost*. 2007;98 (1):90-96.
406. Fair DS, Marlar RA. Biosynthesis and secretion of factor VII, protein C, protein S, and the Protein C inhibitor from a human hepatoma cell line. *Blood*. 1986;67 (1):64-70.
407. Fair DS, Marlar RA, Levin EG. Human endothelial cells synthesize protein S. *Blood*. 1986;67 (4):1168-1171.
408. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol*. 2008;8 (5):327-336.
409. Benzakour O, Kanthou C. The anticoagulant factor, protein S, is produced by cultured human vascular smooth muscle cells and its expression is up-regulated by thrombin. *Blood*. 2000;95 (6):2008-2014.
410. Benzakour O, Gely A, Lara R, Coronas V. [Gas-6 and protein S: vitamin K-dependent factors and ligands for the TAM tyrosine kinase receptors family]. *Med Sci (Paris)*. 2007;23 (10):826-833.

Bibliographie

411. Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood*. 2004;103 (4):1192-1201.
412. Rigby AC, Grant MA. Protein S: a conduit between anticoagulation and inflammation. *Crit Care Med*. 2004;32 (5 Suppl):S336-341.
413. Dahlback B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost*. 1991;66 (1):49-61.
414. Nelstuen GL, Shah AM, Harvey SB. Vitamin K-dependent proteins. *Vitam Horm*. 2000;58 355-389.
415. Saller F, Villoutreix BO, Amelot A, et al. The gamma-carboxyglutamic acid domain of anticoagulant protein S is involved in activated protein C cofactor activity, independently of phospholipid binding. *Blood*. 2005;105 (1):122-130.
416. Drakenberg T, Ghasriani H, Thulin E, et al. Solution structure of the Ca²⁺-Binding EGF3-4 pair from vitamin K-dependent protein S: identification of an unusual fold in EGF3. *Biochemistry*. 2005;44 (24):8782-8789.
417. Persson KE, Stenflo J, Linse S, et al. Binding of calcium to anticoagulant protein S: role of the fourth EGF module. *Biochemistry*. 2006;45 (35):10682-10689.
418. Furie B, Bouchard BA, Furie BC. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood*. 1999;93 (6):1798-1808.
419. Wallin R, Hutson SM. Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Trends Mol Med*. 2004;10 (7):299-302.
420. Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *J Biol Chem*. 2004;279 (24):25276-25283.
421. Wallin R, Hutson SM, Cain D, Sweatt A, Sane DC. A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *Faseb J*. 2001;15 (13):2542-2544.
422. He X, Shen L, Bjartell A, Dahlback B. The gene encoding vitamin K-dependent anticoagulant protein S is expressed in multiple rabbit organs as demonstrated by northern blotting, in situ hybridization, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1995;43 (1):85-96.
423. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol*. 1993;13 (8):4976-4985.
424. Hafizi S, Dahlback B. Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *Febs J*. 2006;273 (23):5231-5244.
425. Smiley ST, Boyer SN, Heeb MJ, Griffin JH, Grusby MJ. Protein S is inducible by interleukin 4 in T cells and inhibits lymphoid cell procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94 (21):11484-11489.
426. Liu D, Guo H, Griffin JH, Fernandez JA, Zlokovic BV. Protein S confers neuronal protection during ischemic/hypoxic injury in mice. *Circulation*. 2003;107 (13):1791-1796.
427. Fernandez JA, Heeb MJ, Xu X, Singh I, Zlokovic BV, Griffin JH. Species-specific anticoagulant and mitogenic activities of murine protein S. *Haematologica*. 2009;94 (12):1721-1731.
428. Gasic GP, Arenas CP, Gasic TB, Gasic GJ. Coagulation factors X, Xa, and protein S as potent mitogens of cultured aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89 (6):2317-2320.
429. Smiley ST, Stitt TN, Grusby MJ. Cross-linking of protein S bound to lymphocytes promotes aggregation and inhibits proliferation. *Cell Immunol*. 1997;181 (2):120-126.

Bibliographie

430. Tomobe YI, Hama H, Sakurai T, Fujimori A, Abe Y, Goto K. Anticoagulant factor protein S inhibits the proliferation of rat astrocytes after injury. *Neurosci Lett*. 1996;214 (1):57-60.
431. Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol*. 2003;4 (1):87-91.
432. Webb JH, Blom AM, Dahlback B. Vitamin K-dependent protein S localizing complement regulator C4b-binding protein to the surface of apoptotic cells. *J Immunol*. 2002;169 (5):2580-2586.
433. Wimmel A, Rohner I, Ramaswamy A, et al. Synthesis and secretion of the anticoagulant protein S and coexpression of the Tyro3 receptor in human lung carcinoma cells. *Cancer*. 1999;86 (1):43-49.
434. Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zawadzki R, Zimnoch L, Kisiel W. Expression of protein C (PC), protein S (PS) and thrombomodulin (TM) in human colorectal cancer. *Thromb Res*. 2009;125 (3):e71-75.
435. Stitt TN, Conn G, Gore M, et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*. 1995;80 (4):661-670.
436. Guo H, Barrett TM, Zhong Z, et al. Protein S blocks the extrinsic apoptotic cascade in tissue plasminogen activator/N-methyl D-aspartate-treated neurons via Tyro3-Akt-FKHRL1 signaling pathway. *Mol Neurodegener*. 2011;6 13.
437. Zhong Z, Wang Y, Guo H, et al. Protein S protects neurons from excitotoxic injury by activating the TAM receptor Tyro3-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway through its sex hormone-binding globulin-like region. *J Neurosci*. 2010;30 (46):15521-15534.
438. Uehara H, Shacter E. Auto-oxidation and oligomerization of protein S on the apoptotic cell surface is required for Mer tyrosine kinase-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol*. 2008;180 (4):2522-2530.
439. Liao D, Wang X, Li M, Lin PH, Yao Q, Chen C. Human protein S inhibits the uptake of AcLDL and expression of SR-A through Mer receptor tyrosine kinase in human macrophages. *Blood*. 2009;113 (1):165-174.
440. Zhu D, Wang Y, Singh I, et al. Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor. *Blood*. 2010;115 (23):4963-4972.
441. Nakamura YS, Hakeda Y, Takakura N, et al. Tyro 3 receptor tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts. *Stem Cells*. 1998;16 (3):229-238.
442. Chen J, Carey K, Godowski PJ. Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene*. 1997;14 (17):2033-2039.
443. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, et al. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996;271 (47):30022-30027.
444. Godowski PJ, Mark MR, Chen J, Sadick MD, Raab H, Hammonds RG. Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro 3. *Cell*. 1995;82 (3):355-358.
445. Mark MR, Chen J, Hammonds RG, Sadick M, Godowsk PJ. Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J Biol Chem*. 1996;271 (16):9785-9789.
446. Hall MO, Obin MS, Heeb MJ, Burgess BL, Abrams TA. Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2005;81 (5):581-591.

447. Prasad D, Rothlin CV, Burrola P, et al. TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci*. 2006;33 (1):96-108.
448. Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res*. 2008;100 35-83.
449. Liu E, Hjelle B, Bishop JM. Transforming genes in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85 (6):1952-1956.
450. Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, et al. A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene*. 1991;6 (11):2113-2120.
451. Rescigno J, Mansukhani A, Basilico C. A putative receptor tyrosine kinase with unique structural topology. *Oncogene*. 1991;6 (10):1909-1913.
452. Lai C, Lemke G. An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron*. 1991;6 (5):691-704.
453. Jia R, Mayer BJ, Hanafusa T, Hanafusa H. A novel oncogene, v-ryk, encoding a truncated receptor tyrosine kinase is transduced into the RPL30 virus without loss of viral sequences. *J Virol*. 1992;66 (10):5975-5987.
454. Jia R, Hanafusa H. The proto-oncogene of v-eyk (v-ryk) is a novel receptor-type protein tyrosine kinase with extracellular Ig/GN-III domains. *J Biol Chem*. 1994;269 (3):1839-1844.
455. Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ*. 1994;5 (6):647-657.
456. Ling L, Kung HJ. Mitogenic signals and transforming potential of Nyk, a newly identified neural cell adhesion molecule-related receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*. 1995;15 (12):6582-6592.
457. Weier HU, Fung J, Lersch RA. Assignment of protooncogene MERTK (a.k.a. c-mer) to human chromosome 2q14.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1999;84 (1-2):91-92.
458. Graham DK, Bowman GW, Dawson TL, Stanford WL, Earp HS, Snodgrass HR. Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase. *Oncogene*. 1995;10 (12):2349-2359.
459. Hafizi S, Dahlback B. Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17 (4):295-304.
460. Valverde P. Effects of Gas6 and hydrogen peroxide in Axl ubiquitination and downregulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333 (1):180-185.
461. Feng W, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM, Vollrath D. Mertk triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277 (19):17016-17022.
462. Sather S, Kenyon KD, Lefkowitz JB, et al. A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood*. 2007;109 (3):1026-1033.
463. Crosier PS, Freeman SA, Orlic D, Bodine DM, Crosier KE. The Dtk receptor tyrosine kinase, which binds protein S, is expressed during hematopoiesis. *Exp Hematol*. 1996;24 (2):318-323.
464. Faust M, Ebensperger C, Schulz AS, et al. The murine ufo receptor: molecular cloning, chromosomal localization and in situ expression analysis. *Oncogene*. 1992;7 (7):1287-1293.
465. O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, et al. axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*. 1991;11 (10):5016-5031.

466. Bellosta P, Costa M, Lin DA, Basilico C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol Cell Biol.* 1995;15 (2):614-625.
467. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med.* 2001;7 (2):215-221.
468. Behrens EM, Gadue P, Gong SY, Garrett S, Stein PL, Cohen PL. The mer receptor tyrosine kinase: expression and function suggest a role in innate immunity. *Eur J Immunol.* 2003;33 (8):2160-2167.
469. Lapraz F, Rottinger E, Duboc V, et al. RTK and TGF-beta signaling pathways genes in the sea urchin genome. *Dev Biol.* 2006;300 (1):132-152.
470. Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, et al. Structural basis for Gas6-Axl signalling. *Embo J.* 2006;25 (1):80-87.
471. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, et al. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest.* 2005;115 (2):237-246.
472. Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsushima GK. Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J Immunol.* 2007;178 (9):5635-5642.
473. Taylor IC, Roy S, Varmus HE. Overexpression of the Sky receptor tyrosine kinase at the cell surface or in the cytoplasm results in ligand-independent activation. *Oncogene.* 1995;11 (12):2619-2626.
474. Burchert A, Attar EC, McCloskey P, Fridell YW, Liu ET. Determinants for transformation induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* 1998;16 (24):3177-3187.
475. Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, et al. A promiscuous liaison between IL-15 receptor and Axl receptor tyrosine kinase in cell death control. *Embo J.* 2005;24 (24):4260-4270.
476. Lu Q, Gore M, Zhang Q, et al. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature.* 1999;398 (6729):723-728.
477. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science.* 2001;293 (5528):306-311.
478. Toshima J, Ohashi K, Iwashita S, Mizuno K. Autophosphorylation activity and association with Src family kinase of Sky receptor tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209 (2):656-663.
479. Hafizi S, Gustafsson A, Stenhoff J, Dahlback B. The Ran binding protein RanBPM interacts with Axl and Sky receptor tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37 (11):2344-2356.
480. Lan Z, Wu H, Li W, et al. Transforming activity of receptor tyrosine kinase tyro3 is mediated, at least in part, by the PI3 kinase-signaling pathway. *Blood.* 2000;95 (2):633-638.
481. Katagiri M, Hakeda Y, Chikazu D, et al. Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts. *J Biol Chem.* 2001;276 (10):7376-7382.
482. Braunger J, Schleithoff L, Schulz AS, et al. Intracellular signaling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene.* 1997;14 (22):2619-2631.
483. Fridell YW, Jin Y, Quilliam LA, et al. Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* 1996;16 (1):135-145.

484. Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C. Gas6-mediated survival in NIH3T3 cells activates stress signalling cascade and is independent of Ras. *Oncogene*. 1999;18 (29):4224-4236.
485. Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1997;17 (8):4442-4453.
486. Demarchi F, Verardo R, Varnum B, Brancolini C, Schneider C. Gas6 anti-apoptotic signaling requires NF-kappa B activation. *J Biol Chem*. 2001;276 (34):31738-31744.
487. Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B, Blostein MD. Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287 (3):H1207-1213.
488. Allen MP, Linseman DA, Udo H, et al. Novel mechanism for gonadotropin-releasing hormone neuronal migration involving Gas6/Ark signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*. 2002;22 (2):599-613.
489. Nielsen-Preiss SM, Allen MP, Xu M, et al. Adhesion-related kinase induction of migration requires phosphatidylinositol-3-kinase and ras stimulation of rac activity in immortalized gonadotropin-releasing hormone neuronal cells. *Endocrinology*. 2007;148 (6):2806-2814.
490. Hafizi S, Alindri F, Karlsson R, Dahlback B. Interaction of Axl receptor tyrosine kinase with C1-TEN, a novel C1 domain-containing protein with homology to tensin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;299 (5):793-800.
491. Ruan GX, Kazlauskas A. Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt. *Embo J*. 2012;31 (7):1692-1703.
492. van Ginkel PR, Gee RL, Shearer RL, et al. Expression of the receptor tyrosine kinase Axl promotes ocular melanoma cell survival. *Cancer Res*. 2004;64 (1):128-134.
493. Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol*. 2005;204 (1):36-44.
494. Fridell YW, Villa J, Jr., Attar EC, Liu ET. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1998;273 (12):7123-7126.
495. Shieh YS, Lai CY, Kao YR, et al. Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia*. 2005;7 (12):1058-1064.
496. Shiozawa Y, Pedersen EA, Patel LR, et al. GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche. *Neoplasia*. 2010;12 (2):116-127.
497. Wimmel A, Glitz D, Kraus A, Roeder J, Schuermann M. Axl receptor tyrosine kinase expression in human lung cancer cell lines correlates with cellular adhesion. *Eur J Cancer*. 2001;37 (17):2264-2274.
498. Li Y, Ye X, Tan C, et al. Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene*. 2009;28 (39):3442-3455.
499. Gustafsson A, Bostrom AK, Ljungberg B, Axelsson H, Dahlback B. Gas6 and the receptor tyrosine kinase Axl in clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One*. 2009;4 (10):e7575.
500. Holland SJ, Powell MJ, Franci C, et al. Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation. *Cancer Res*. 2005;65 (20):9294-9303.
501. Hutterer M, Knyazev P, Abate A, et al. Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*. 2008;14 (1):130-138.
502. Hector A, Montgomery EA, Karikari C, et al. The Axl receptor tyrosine kinase is an adverse prognostic factor and a therapeutic target in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2010;10 (10):1009-1018.

503. Ghosh AK, Secreto C, Boysen J, et al. The novel receptor tyrosine kinase Axl is constitutively active in B-cell chronic lymphocytic leukemia and acts as a docking site of nonreceptor kinases: implications for therapy. *Blood*. 2010;117 (6):1928-1937.
504. Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, et al. AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res*. 2008;68 (6):1905-1915.
505. Holland SJ, Pan A, Franci C, et al. R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 2010;70 (4):1544-1554.
506. Ling L, Templeton D, Kung HJ. Identification of the major autophosphorylation sites of Nyk/Mer, an NCAM-related receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 1996;271 (31):18355-18362.
507. Todt JC, Hu B, Curtis JL. The receptor tyrosine kinase MerTK activates phospholipase C gamma2 during recognition of apoptotic thymocytes by murine macrophages. *J Leukoc Biol*. 2004;75 (4):705-713.
508. Sen P, Wallet MA, Yi Z, et al. Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF-kappaB activation in dendritic cells. *Blood*. 2007;109 (2):653-660.
509. Guttridge KL, Luft JC, Dawson TL, et al. Mer receptor tyrosine kinase signaling: prevention of apoptosis and alteration of cytoskeletal architecture without stimulation or proliferation. *J Biol Chem*. 2002;277 (27):24057-24066.
510. Wu YM, Robinson DR, Kung HJ. Signal pathways in up-regulation of chemokines by tyrosine kinase MER/NYK in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2004;64 (20):7311-7320.
511. Georgescu MM, Kirsch KH, Shishido T, Zong C, Hanafusa H. Biological effects of c-Mer receptor tyrosine kinase in hematopoietic cells depend on the Grb2 binding site in the receptor and activation of NF-kappaB. *Mol Cell Biol*. 1999;19 (2):1171-1181.
512. Mahajan NP, Earp HS. An SH2 domain-dependent, phosphotyrosine-independent interaction between Vav1 and the Mer receptor tyrosine kinase: a mechanism for localizing guanine nucleotide-exchange factor action. *J Biol Chem*. 2003;278 (43):42596-42603.
513. Xiong W, Chen Y, Wang H, et al. Gas6 and the Tyro 3 receptor tyrosine kinase subfamily regulate the phagocytic function of Sertoli cells. *Reproduction*. 2008;135 (1):77-87.
514. Ek S, Hogerkorp CM, Dictor M, Ehinger M, Borrebaeck CA. Mantle cell lymphomas express a distinct genetic signature affecting lymphocyte trafficking and growth regulation as compared with subpopulations of normal human B cells. *Cancer Res*. 2002;62 (15):4398-4405.
515. Keating AK, Salzberg DB, Sather S, et al. Lymphoblastic leukemia/lymphoma in mice overexpressing the Mer (MerTK) receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 2006;25 (45):6092-6100.
516. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. 2002;1 (2):133-143.
517. Khan J, Bittner ML, Saal LH, et al. cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96 (23):13264-13269.
518. Wu CW, Li AF, Chi CW, et al. Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer. *Anticancer Res*. 2002;22 (2B):1071-1078.
519. Evans CO, Young AN, Brown MR, et al. Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86 (7):3097-3107.
520. Wang Y, Moncayo G, Morin P, Jr., et al. Mer receptor tyrosine kinase promotes invasion and survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene*. 2012.

521. Linger RM, Cohen RA, Cummings CT, et al. Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2012.
522. Linger RM, DeRyckere D, Brandao L, et al. Mer receptor tyrosine kinase is a novel therapeutic target in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009;114 (13):2678-2687.
523. Tworowski K, Singhal G, Szpakowski S, et al. Phosphoproteomic screen identifies potential therapeutic targets in melanoma. *Mol Cancer Res*. 2011;9 (6):801-812.
524. Migdall-Wilson J, Bates C, Schlegel J, et al. Prolonged exposure to a Mer ligand in leukemia: Gas6 favors expression of a partial Mer glycoform and reveals a novel role for Mer in the nucleus. *PLoS One*. 2012;7 (2):e31635.
525. Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature*. 2011;481 (7380):190-194.
526. Benzakour O, Formstone C, Rahman S, et al. Evidence for a protein S receptor(s) on human vascular smooth muscle cells. Analysis of the binding characteristics and mitogenic properties of protein S on human vascular smooth muscle cells. *Biochem J*. 1995;308 (Pt 2) 481-485.
527. Kanthou C, Benzakour O. Cellular effects and signalling pathways activated by the anti-coagulant factor, protein S, in vascular cells protein S cellular effects. *Adv Exp Med Biol*. 2000;476 155-166.
528. Tjwa M, Bellido-Martin L, Lin Y, et al. Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes. *Blood*. 2008;111 (8):4096-4105.
529. Nakano T, Higashino K, Kikuchi N, et al. Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors. *J Biol Chem*. 1995;270 (11):5702-5705.
530. Hao Q, Wang L, Zhao ZJ, Tang H. Identification of protein kinase D2 as a pivotal regulator of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *J Biol Chem*. 2009;284 (2):799-806.
531. Tang H, Chen S, Wang H, Wu H, Lu Q, Han D. TAM receptors and the regulation of erythropoiesis in mice. *Haematologica*. 2009;94 (3):326-334.
532. Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest*. 2004;114 (7):898-907.
533. Grote K, Schuett H, Salguero G, et al. Toll-like receptor 2/6 stimulation promotes angiogenesis via GM-CSF as a potential strategy for immune defense and tissue regeneration. *Blood*. 2010;115 (12):2543-2552.
534. Primeau AJ, Rendon A, Hedley D, Lilge L, Tannock IF. The distribution of the anticancer drug Doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2005;11 (24 Pt 1):8782-8788.
535. Niemisto A, Dunmire V, Yli-Harja O, Zhang W, Shmulevich I. Robust quantification of in vitro angiogenesis through image analysis. *IEEE Trans Med Imaging*. 2005;24 (4):549-553.
536. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193 (1):265-275.
537. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*. 2003;3 (7):643-651.
538. Zachary I, Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res*. 2001;49 (3):568-581.
539. Rousseau S, Houle F, Huot J. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10 (8):321-327.

Bibliographie

540. Goetze S, Eilers F, Bungenstock A, et al. PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293 (5):1431-1437.
541. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res.* 2002;90 (12):1243-1250.
542. Chen L, Sung SS, Yip ML, et al. Discovery of a novel shp2 protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Mol Pharmacol.* 2006;70 (2):562-570.
543. Sylvest L, Bendiksen CD, Houen G. Phosphatase inhibitors with anti-angiogenic effect in vitro. *Apmis.* 2010;118 (1):49-59.
544. Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1378 (1):F79-113.
545. Roskoski R, Jr. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331 (1):1-14.
546. Li Z, Hosoi Y, Cai K, et al. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK 1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341 (2):363-368.
547. Haynes MP, Li L, Sinha D, et al. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem.* 2003;278 (4):2118-2123.
548. Tatin F, Varon C, Genot E, Moreau V. A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *J Cell Sci.* 2006;119 (Pt 4):769-781.
549. Trevisi L, Pighin I, Bazzan S, Luciani S. Inhibition of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) endocytosis by ouabain in human endothelial cells. *FEBS Lett.* 2006;580 (11):2769-2773.
550. Wang Y, Zhen Y, Shi Y, et al. Vitamin k epoxide reductase: a protein involved in angiogenesis. *Mol Cancer Res.* 2005;3 (6):317-323.
551. Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE. On the mechanism(s) of thrombin induced angiogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2000;476 47-55.
552. Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE, Andriopoulou P, Maragoudakis MM. Effects of thrombin/thrombosis in angiogenesis and tumour progression. *Matrix Biol.* 2000;19 (4):345-351.
553. Naldini A, Carney DH, Pucci A, Pasquali A, Carraro F. Thrombin regulates the expression of proangiogenic cytokines via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *Gen Pharmacol.* 2000;35 (5):255-259.
554. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J Biol Chem.* 1999;274 (34):23969-23976.
555. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30 (1):63-69.
556. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Thrombin's central role in angiogenesis and pathophysiological processes. *Eur Cytokine Netw.* 2009;20 (4):171-179.
557. Tsopanoglou NE, Pipili-Synetos E, Maragoudakis ME. Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *Am J Physiol.* 1993;264 (5 Pt 1):C1302-1307.
558. Hollborn M, Kohen L, Werschnik C, Tietz L, Wiedemann P, Bringmann A. Activated Blood Coagulation Factor X (FXa) Induces Angiogenic Growth Factor Expression in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53 (9):5930-5939.
559. Uchiba M, Okajima K, Oike Y, et al. Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res.* 2004;95 (1):34-41.

560. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*. 1994;79 (7):1157-1164.
561. Robinson SD, Hodivala-Dilke KM. The role of beta3-integrins in tumor angiogenesis: context is everything. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23 (5):630-637.
562. Finnemann SC. Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *Embo J*. 2003;22 (16):4143-4154.
563. Finnemann SC. Role of alphavbeta5 integrin in regulating phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Adv Exp Med Biol*. 2003;533 337-342.
564. Wu Y, Singh S, Georgescu MM, Birge RB. A role for Mer tyrosine kinase in alphavbeta5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Cell Sci*. 2005;118 (Pt 3):539-553.
565. Binetruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B, et al. Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *Embo J*. 2000;19 (7):1525-1533.
566. Starzec A, Vassy R, Martin A, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci*. 2006;79 (25):2370-2381.
567. Goyal A, Pal N, Concannon M, et al. Endorepellin, the angiostatic module of perlecan, interacts with both the alpha2beta1 integrin and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2): a dual receptor antagonism. *J Biol Chem*. 2011;286 (29):25947-25962.
568. Fraineau S, Monvoisin A, Clarhaut J, et al. The vitamin K-dependent anti-coagulant factor, protein S, inhibits multiple VEGF-A-induced angiogenesis events in a Mer- and SHP2-dependent manner. *Blood*. 2012.
569. Rodriguez-Ubreva FJ, Cariaga-Martinez AE, Cortes MA, et al. Knockdown of protein tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits G1/S progression in prostate cancer cells through the regulation of components of the cell-cycle machinery. *Oncogene*. 2010;29 (3):345-355.
570. Rikitake Y, Kawashima S, Yamashita T, et al. Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration and proliferation via inhibition of the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20 (4):1006-1012.
571. Won KJ, Lee HM, Lee CK, et al. Protein tyrosine phosphatase SHP-2 is positively involved in platelet-derived growth factor-signaling in vascular neointima formation via the reactive oxygen species-related pathway. *J Pharmacol Sci*. 2011;115 (2):164-175.
572. Nandrot EF, Finnemann SC. Lack of alphavbeta5 integrin receptor or its ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function. *Ophthalmic Res*. 2008;40 (3-4):120-123.
573. Qin S, Rodrigues GA. Roles of alphavbeta5, FAK and MerTK in oxidative stress inhibition of RPE cell phagocytosis. *Exp Eye Res*. 2012;94 (1):63-70.
574. Nandrot EF, Silva KE, Scelfo C, Finnemann SC. Retinal pigment epithelial cells use a MerTK-dependent mechanism to limit the phagocytic particle binding activity of alphavbeta5 integrin. *Biol Cell*. 2012;104 (6):326-341.
575. Fens MH, Mastrobattista E, de Graaff AM, et al. Angiogenic endothelium shows lactadherin-dependent phagocytosis of aged erythrocytes and apoptotic cells. *Blood*. 2008;111 (9):4542-4550.
576. Kirsch T, Woywodt A, Beese M, et al. Engulfment of apoptotic cells by microvascular endothelial cells induces proinflammatory responses. *Blood*. 2007;109 (7):2854-2862.
577. Ishimoto Y, Ohashi K, Mizuno K, Nakano T. Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J Biochem*. 2000;127 (3):411-417.

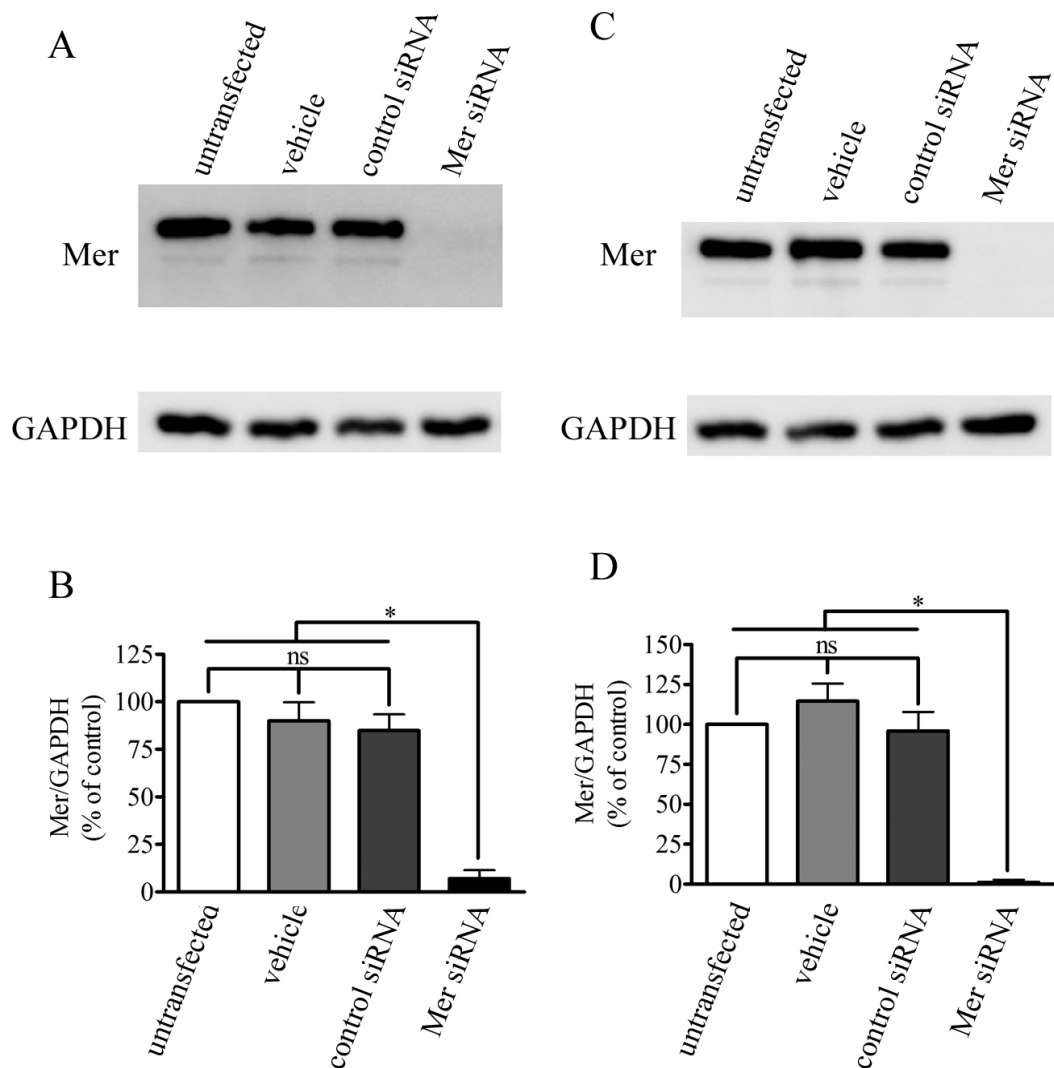
Bibliographie

578. Hall MO, Obin MS, Prieto AL, Burgess BL, Abrams TA. Gas6 binding to photoreceptor outer segments requires gamma-carboxyglutamic acid (Gla) and Ca(2+) and is required for OS phagocytosis by RPE cells in vitro. *Exp Eye Res.* 2002;75 (4):391-400.
579. Hall MO, Prieto AL, Obin MS, et al. Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6. *Exp Eye Res.* 2001;73 (4):509-520.
580. Caberoy NB, Zhou Y, Li W. Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *Embo J.* 2010;29 (23):3898-3910.
581. Caberoy NB, Alvarado G, Bigcas JL, Li W. Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal. *J Cell Physiol.* 2012;227 (2):401-407.
582. Caberoy NB, Alvarado G, Li W. Tubby regulates microglial phagocytosis through MerTK. *J Neuroimmunol.* 2012;252 (1-2):40-48.
583. Collett G, Wood A, Alexander MY, et al. Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ Res.* 2003;92 (10):1123-1129.
584. Heeb MJ, Griffin JH. Activated protein C-dependent and -independent anticoagulant activities of protein S have different structural requirements. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;29 (2):190-199.

Annexes

| | |
|---|-----|
| Annexe 1 : Expression de la protéine Mer après 24 h et 48 h de transfection avec 5 nM de siRNA..... | 267 |
| Annexe 2 : Expression de la protéine phosphatase SHP2 après 24 h et 48 h de transfection avec 5 nM de siRNA | 268 |
| Annexe 3 : Curriculum vitae | 269 |
| Annexe 4 : Article publié | 272 |

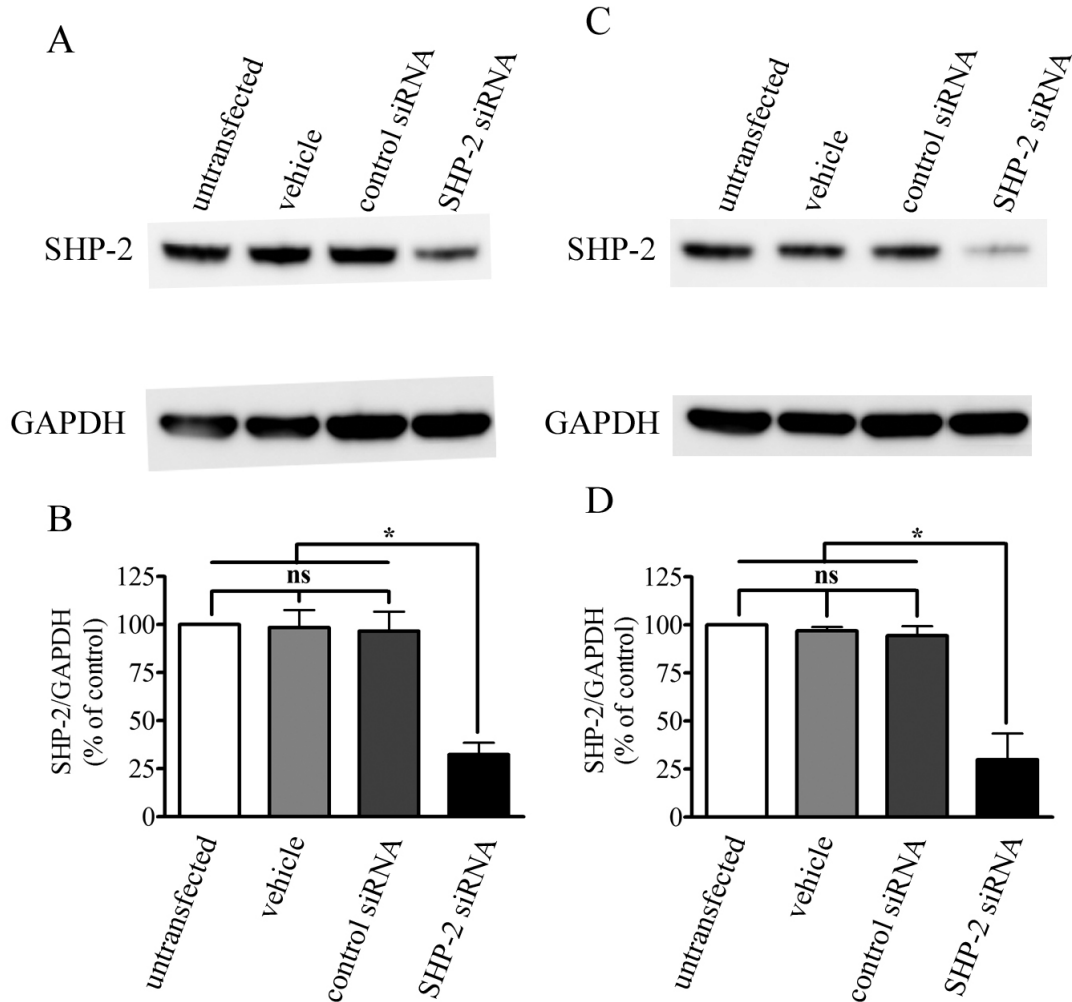
Annexes



Annexe 1 : Expression de la protéine Mer après 24 h et 48 h de transfection avec 5 nM de siRNA

Western blot représentatif de l'expression du récepteur Mer après 24 h (A) ou 48 h (C) de transfection avec ou sans (control) agent transfectant additionnée avec 5 nM de siRNA contrôle, ou Mer. Un Western blot anti-GAPDH a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées.

Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines Mer rapporté à la quantité de protéines GAPDH en condition control après 24 h (B) ou 48 h (D) \pm SD * $p < 0,05$; ns : non significatif (n=3 en uniplicats).



Annexe 2 : Expression de la protéine phosphatase SHP2 après 24 h et 48 h de transfection avec 5 nM de siRNA


Western blot représentatif de l'expression de la protéine phosphatase SHP2 après 24 h (A) ou 48 h (C) de transfection avec ou sans (control) agent transfectant contenant 5 nM de siRNA contrôle, ou SHP2. Un Western blot anti-GAPDH a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées.


Quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Fredericks, MD). Les données sont exprimées en pourcentage moyen de la quantité de protéines SHP2 rapporté à la quantité de protéines GAPDH en condition control après 24 h (B) ou 48 h (D) \pm SD * $p < 0,05$; ns : non significatif (n=3 en uniplicats).


Annexe 3 : Curriculum vitae

Sylvain FRAINEAU, Doctorant en Biologie Cellulaire et Moléculaire

Né le 21 décembre 1984 à Saintes

Contact :  : Apt 11 résidence Purnon - 21 place Jutreau - 86000 Poitiers

 : 06 82 29 79 19

 : sylvain.fraineau @univ-poitiers.fr

Compétences techniques

Biochimie et biologie moléculaire

Extraction et purification d'ARN, transcription inverse (RT) et PCR quantitative en temps réel (SYBR Green), PCR, séquençage d'ADN, Western blotting, immunoprécipitation, zymographie, immunocytochimie.

Biologie cellulaire

Culture cellulaire de lignées tumorales adhérentes, culture cellulaire primaire de cellules endothéliales (cellules endothéliales : HUVECs), transfection transitoire (HUVECs), interférence ARN (siRNA), test angiogénique (morphogénèse sur Matrigel), test de viabilité/cytotoxicité (MTS), test ELISA de prolifération cellulaire (Incorporation de BrdU), tests de migration/invasion (Chambre de Boyden).

Techniques *in vivo*

Test angiogénique (Matrigel Plug assay), Xénogreffe de cellules tumorales (B16/F10) injections sous-cutanée (modèle de croissance tumorale) et intra-veineuse (modèle de dissémination métastatique).

Informatique

Bureautique (Pack Office, Graphpad, Endnote, Photoshop), logiciels d'analyse (AngioQuant, Fiji Image J, Scion Image).

Formation

2009-2012 : Doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire (bourse MESR) : *Rôle des protéines vitamine K-dépendantes au cours de l'angiogenèse tumorale.* Équipe Physiopathologie de la Communication et de la Différenciation Cellulaires (PCDC), Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires (IPBC), CNRS FRE 3511, Université de Poitiers (86).

Directeurs de thèse : Pr. Omar Benzakour, IPBC, CNRS FRE 3511 ; omar.benzakour@univ-poitiers.fr.

Co-directeur de thèse : Dr. Arnaud Monvoisin, IPBC, CNRS FRE 3511 ; arnaud.monvoisin@univ-poitiers.fr.

2007-2008 : Master Recherche Physiologie Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université de Poitiers (86), **mention Assez Bien.**

Stage Janvier-Juin 2008 : *Étude de l'implication de la protéine S dans la tumorigenèse in vitro et in vivo.* IPBC, UMR CNRS 6187 de l'Université de Poitiers (86).

Directeurs de stage : Pr. Omar Benzakour, IPBC, UMR CNRS 6187.

Dr. Arnaud Monvoisin, IPBC, UMR CNRS 6187.

2006-2007 : Maîtrise Physiologie Animale et de Pharmacologie, Université de Poitiers (86), **mention Bien.**

Stage Avril-Mai 2007: *Étude de l'effet du MPB-95 sur la relaxation des muscles lisses de la trachée chez le rat et la souris.*

Équipe canaux et épithélium, IPBC, UMR CNRS 6187 de l'Université de Poitiers (86).

Directeur de stage : Pr. Frédéric Becq, Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires (IPBC) UMR CNRS 6187.

2005-2006 : Maîtrise Ecologie, Écosystèmes et Anthropisation, Université Paul Sabatier de Toulouse (31).

2004-2005 : Licence Biologie Générale, Université de La Rochelle (17).

Stage Avril-Juin 2005: *Étude écotoxicologique de l'impact de produits génotoxiques sur des cellules de truite arc-en-ciel (comet assay).*

Laboratoire Écotoxicologie, Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral Département Polluant Chimiques (DEL-PC) centre IFREMER de Nantes (44).

Directeur de stage : Dr. Farida Akcha laboratoire Écotoxicologie, Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral Département Polluant Chimiques (DEL-PC) centre IFREMER de Nantes.

2002-2004 : DUT Génie Biologique, Analyses Biologiques et Biochimiques, l'IUT de La Rochelle (17), mention Assez Bien.

Stage Avril-Juin 2004 *Étude écotoxicologique de l'impact des déchets agricoles en milieu marin, tests sur l'huître Crassostrea gigas.*

Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais (LERPC) Station IFREMER de la Tremblade (17).

Directeur de stage : Dr. Daniel Masson Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais (LERPC) station IFREMER de La Tremblade.

2002 : Baccalauréat Scientifique spécialité physique-chimie, lycée de la mer et du littoral de Bourcefranc (17).

Expérience professionnelle

- **2011-2012 : Doctorant Contractuel A Charge d'Enseignement (DCACE)**, Université de Poitiers.
Enseignement : Département de Biologie Cellulaire (section CNU 65), 8h de TD (L2) et 55h de TP (33h L1 et 22h L2).
- **Janvier - Septembre 2009 : Technicien de laboratoire**, laboratoire de thérapie cellulaire, Etablissement Français du Sang (EFS) Centre-Atlantique, Poitiers (86).

Publications et Brevets

Publications

- **Fraineau S**, Monvoisin A, Clarhaut J, Talbot J, Simonneau C, Kanthou C, Kanse S, Philippe M and Benzakour O.
The vitamin K-dependent anti-coagulant factor, protein S, inhibits multiple VEGF-A-dependent angiogenesis related events in a Mer- and SHP2-dependent manner (*Sous press, accepté dans Blood le 18 Septembre 2012*).
- **Fraineau S** et al.
The anticoagulant factor, protein S, activates Mer/SHP-2 axis to stimulate endothelial cell proliferation (*en préparation*).

Brevet

- Utilisation du facteur anti-coagulant, la protéine S humaine, comme médicament pour traiter la prolifération de cellules tumorales.

Invention déposé à l'INPI le 14 novembre 2011 au nom du CNRS et de l'Université de Poitiers (n° dossier : BR89500SLHKC).

Inventeurs : Benzakour O et Monvoisin A.

Collaborateurs : **Fraineau S**, Philippe M et Bourdeau L

Posters

- **Fraineau S**, Monvoisin A, Clarhaut J, Talbot J, Simonneau C, Kanthou C, Kanse S, Philippe M and Benzakour O.
The vitamin K-dependent anti-coagulant factor, protein S, inhibits in a Mer- and SHP2- dependent manner, multiple VEGF-A- dependent angiogenesis related events.
International Vascular Biology Meeting, Wiesbaden (Allemagne), 2-5 juin 2012.
- **Fraineau S**, Monvoisin A, Talbot J, Clarhaut J, Kanse S, Philippe M and Benzakour O.
The vitamin K-dependent anti-coagulant factor, protein S, regulates angiogenesis *in vitro* and *in vivo*.
3^e Congrès de la Société Française d'Angiogenèse (SFA), Bordeaux (France), 9-11 octobre 2011.
- **Fraineau S**, Philippe M, Talbot J, Monvoisin A, and Benzakour O.
Protein S regulates VEGFR-2 activation and subsequent endothelial cell proliferation.
Cell Signal Omics, Luxembourg (Luxembourg), 26-29 janvier 2011.
- **Fraineau S**, Talbot J, Monvoisin A and Benzakour O.
Evidence for a major role of protein S in regulating angiogenesis both *in vitro* and *in vivo*.
2^e Congrès de la Société Française d'Angiogenèse (SFA), La Grande Motte (France), 9-11 mai 2010.

Communication orale

- **Fraineau S**, Monvoisin A, Clarhaut J, Talbot J, Simonneau C, Kanthou C, Kanse S, Philippe M and Benzakour O.
The vitamin K-dependent anti-coagulant factor, protein S, regulates angiogenesis *in vitro* and *in vivo*.
3^e journées du Groupe Poitevin de la Recherche contre le Cancer (GPRC), Poitiers (France), 3 Juillet 2012.
1^{er} prix de la présentation orale décernée par le comité d'organisation scientifique

Implication dans la communauté scientifique

- **2012 : Représentant doctorant au conseil de laboratoire**, Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires (IPBC) FRE 3511, Université de Poitiers (86).
- **2009-2012 : Représentant doctorant au conseil de l'école doctorale**, ED 524 Biosanté, Université de Poitiers (86).

Divers et centres d'intérêt

Sports

- **2007, 2008** : Marathon du Médoc, Pauillac (33).
- **2004** : 12^e Championnat de France Universitaire d'aviron de mer 4 barré, Brest (29).

Emplois étudiants

- **Octobre 2008 - Janvier 2009 : Equipier** restauration rapide, Quick, Poitiers (86).
- **Juillet-Août 2002-2008 : Réceptionniste/Placeur**, camping international L'anse de Pins****, Domino (17).

Divers

- **2006** : Attestation de Formation aux Premiers Secours (AFPS), Poitiers (86).
Permis Mer côtier, La Rochelle (17).
- **2003** : Permis de conduire catégorie B, Le Château d'Oléron (17).

Annexe 4 : Article publié

blood

2012 120: 5073-5083
Prepublished online October 12, 2012;
doi:10.1182/blood-2012-05-429183

The vitamin K–dependent anticoagulant factor, protein S, inhibits multiple VEGF-A –induced angiogenesis events in a Mer- and SHP2-dependent manner

Sylvain Fraigneau, Arnaud Monvoisin, Jonathan Clarhaut, Julie Talbot, Claire Simonneau, Chryso Kanthou, Sandip M. Kanse, Michel Philippe and Omar Benzakour

Updated information and services can be found at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/120/25/5073.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
[Vascular Biology](#) (381 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>



The vitamin K–dependent anticoagulant factor, protein S, inhibits multiple VEGF-A–induced angiogenesis events in a Mer- and SHP2-dependent manner

Sylvain Fraineau,¹ Arnaud Monvoisin,¹ Jonathan Clarhaut,² Julie Talbot,¹ Claire Simonneau,¹ Chryso Kanthou,³ Sandip M. Kanse,⁴ Michel Philippe,¹ and Omar Benzakour¹

¹Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires, Centre National de la Recherche Scientifique, Formation de Recherche en Evolution 3511, Université de Poitiers, Poitiers, France; ²InsERM Centre d'Investigation Clinique 0802, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Poitiers, France; ³Cancer Research United Kingdom Tumour Microcirculation Group, University of Sheffield, Department of Oncology, Cancer Research United Kingdom/Yorkshire Cancer Research Sheffield Cancer Centre, The Medical School, Sheffield, United Kingdom; and ⁴Institute for Basic Medical Sciences, University of Oslo, Oslo, Norway

Protein S is a vitamin K–dependent glycoprotein, which, besides its anticoagulant function, acts as an agonist for the tyrosine kinase receptors Tyro3, Axl, and Mer. The endothelium expresses Tyro3, Axl, and Mer and produces protein S. The interaction of protein S with endothelial cells and particularly its effects on angiogenesis have not yet been analyzed. Here we show that human protein S, at circulating concentrations, inhibited vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2–dependent vascularization of Matrigel

plugs in vivo and the capacity of endothelial cells to form capillary-like networks in vitro as well as VEGF-A–induced endothelial migration and proliferation. Furthermore, protein S inhibited VEGF-A–induced endothelial VEGFR2 phosphorylation and activation of mitogen-activated kinase-Erk1/2 and Akt. Protein S activated the tyrosine phosphatase SHP2, and the SHP2 inhibitor NSC 87877 reversed the observed inhibition of VEGF-A–induced endothelial proliferation. Using siRNA directed against

Tyro3, Axl, and Mer, we demonstrate that protein S-mediated SHP2 activation and inhibition of VEGF-A–stimulated proliferation were mediated by Mer. Our report provides the first evidence for the existence of a protein S/Mer/SHP2 axis, which inhibits VEGFR2 signaling, regulates endothelial function, and points to a role for protein S as an endogenous angiogenesis inhibitor. (*Blood*. 2012;120(25):5073-5083)

Introduction

Protein S (ProS), encoded by *PROS1* gene, is a vitamin K–dependent plasma glycoprotein¹ that acts as an anticoagulant both as a cofactor for the anticoagulant factor-activated protein C² (aPC) and independently of aPC.³ The importance of the anticoagulant activity of ProS is revealed by the lethal thrombotic complications suffered by homozygous *PROS1*-deficient mice.⁴ Less severe ProS deficiencies, resulting from heterozygous mutations or polymorphisms, are associated with risks for venous and arterial thrombosis, vascular calcification, and other thrombotic complications.⁵ Analysis of either mouse embryos from *PROS1* gene mutants or from mice in which *PROS1* gene was conditionally deleted in vascular smooth muscle cells revealed defects in vessel development and function not seen in mice lacking protein C (PC), implying thereby the existence of PC-independent major regulatory functions of ProS in vascular development and homeostasis.⁴

ProS circulates in human plasma at a concentration of ~ 25 µg/mL in free form (40%) and in complex (60%) with C4b-binding protein (C4BP).¹ In humans, most of plasma ProS is thought to be synthesized in the liver by hepatocytes.⁶ However, ProS is also produced at extrahepatic sites by several cell types, including macrophages,⁷ vascular endothelial cells (ECs),⁸ and vascular smooth muscle cells.⁹ In these cells, ProS plays no apparent role in blood coagulation, but together with its structural homolog protein Gas6, acts as an agonist for the TAM (Tyro3, Axl, and Mer) family of receptor tyrosine kinases.^{7,10,11} ProS has been

shown to act as a ligand for Mer in the retina¹² and macrophages,¹³ for Tyro3 in brain endothelial cells¹⁴ and neurons¹⁵ and for both Mer and Tyro3 in retinal epithelium.¹⁶ As a TAM receptor agonist, ProS regulates a variety of cellular activities, including the phagocytic clearance of apoptotic cells¹⁷ and the homeostatic regulation of the immune system.^{7,11}

ProS/TAM interactions may play a role in vascular function, because ProS and TAM receptors are expressed by ECs,^{14,18} pericytes,¹⁹ and vascular smooth muscle cells.²⁰ Recently, using tissue-specific conditional *PROS1* knockout mice, it was demonstrated that extrahepatic ProS represents ~ 45% of normal circulating ProS and that much of this residual ProS is produced by ECs.⁴ ECs play key roles in many processes, among which angiogenesis is a major one.^{21,22} Sprouting angiogenesis follows the remodeling and maturation of the primitive vascular plexus during development and plays a major role in adult life as part of both physiologic and pathologic processes.^{21,22} Under physiologic conditions, angiogenesis is regulated by a fine-tuning balance between endogenous promoters and inhibitors.²¹ The perturbation of this balance may lead to the excessive formation of aberrant and immature capillaries contributing to the pathogenesis of tumor growth and metastasis among other disorders.²²

Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and basic fibroblast growth factor (bFGF) are major promoters of angiogenesis.^{21,22} VEGF-A is considered as a rate-limiting factor for

Submitted May 10, 2012; accepted September 18, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, October 12, 2012; DOI 10.1182/blood-2012-05-429183.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

physiologic angiogenesis and plays an important role in pathologic angiogenesis.²³ VEGF-A is the agonist of tyrosine kinase receptors, VEGFR-1 and VEGFR2, the latter being the major transducer of angiogenic signaling in endothelial cells in adult life.²³ On this basis, VEGF-A signaling inhibitors or VEGF-A neutralizing antibodies are used for treating pathologic angiogenesis.²¹⁻²³ Although the endothelium expresses TAM receptors and is a major source of ProS,⁴ the pathophysiologic relevance of ProS interactions with ECs and in particular its possible effects on angiogenesis were not as yet investigated. In the present report, we combined in vivo and in vitro approaches to investigate the role of human ProS in angiogenesis. We demonstrate that human ProS inhibits VEGFR2-dependent activation of human ECs, thereby suggesting that ProS may be a natural endogenous inhibitor of angiogenesis that may be used for targeting aberrant angiogenesis-associated disorders.

Methods

Cells

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, Lonza Walkersville) were cultured in endothelial growth medium-2 (EGM-2; cc-3162, Lonza Walkersville) referred to as growth factor containing medium as described previously²⁴ and used at early passages 1-6. When indicated, HUVEC cultures were switched to EBM-2 medium (Lonza Walkersville) referred to as a growth factor-depleted medium that was supplemented with either 0.5% FCS or ITS (insulin 10 µg/mL, transferrin 6.7 ng/mL, selenium 5.5 µg/mL). Cells were kept at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator.

Animals

C57BL/6 male mice were used in this study. All experimental procedures involving animals were carried out in accordance with the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry (decree 87849), the European Communities Council Directive (2010/63/UE), and our local ethics committee.

Materials

Human ProS was from Enzyme Research Laboratories. It was purified from fresh frozen human plasma, characterized by the supplier as a single band at 69 kDa on SDS-PAGE and described as highly pure. Human ProS from a different supplier (Calbiochem) was also tested (in both in vivo Matrigel and BrdU incorporation assays) to exclude the possibility that some of the observed effects may be the result of contaminants in the preparation. Human albumin and heparin were obtained from Sigma-Aldrich, and ITS was from Invitrogen. Basement membrane matrix (Matrigel) was purchased from BD Biosciences Discovery Labware. NSC87877 SHP 1/2 inhibitor²⁵ was from Tocris Bioscience. Recombinant human endostatin was from Biopur. Recombinant mouse bFGF was from R&D Systems. Recombinant human bFGF and recombinant VEGF-A 165 isoform, both mouse and human, were from Invitrogen.

In vivo Matrigel plug assay

This assay was performed as described previously.²⁶ Briefly, Matrigel was supplemented with either a mixture of proangiogenic factors (recombinant mouse bFGF and recombinant mouse VEGF-A each at 400 ng/mL and heparin at 50 units/mL) or with human ProS (either from Enzyme Research Laboratories or from Calbiochem) at 25 µg/mL, with a combination of the above or with vehicle. Eight- to 10-week-old C57BL/6 mice (n = 8) were injected subcutaneously in the flank with 0.4 mL Matrigel. Mice were killed after 7 days, and Matrigel plugs were removed, photographed, then fixed overnight in 10% formalin and embedded in paraffin. Sections (4 µm) were stained with either hematoxylin and eosin or with eosin and anti-CD31 mouse antibody (BD Pharmingen). Vascular structures or CD31-positive area were photographed using a MVX10 microscope (objective: 2×/5; 22°C;

medium: Mowiol; Camera: DP25-4; cellSens Dimension Version 1.4 software, Olympus). Vascular areas identified by the presence of a lumen and red blood cells or CD31-positive area were quantified using the Fiji-win32 software and expressed as percentage vascular area per field.^{27,28} Data were obtained from 3 independent experiments (for each experimental point: 3 Matrigel plugs, each from a distinct mouse) and from 3 random sections of each Matrigel plug were quantified and are expressed as either vascular area percentage per field or CD31-positive area percentage per field using Fiji-win32 software as described previously.^{27,28}

In vitro morphogenesis assay

This assay was performed as described previously.²⁹ Matrigel was supplemented with human ProS, human endostatin, or human albumin at the indicated concentrations, coated to each well of a 24-well plate, and kept at room temperature for 4 hours to allow gel formation. HUVECs (10⁵ cells/well) were then plated onto the Matrigel in growth factor-depleted medium (EBM-2 containing 0.5% FCS). After 24 hours, they were fixed in 4% paraformaldehyde. The 3-dimensional cell organization was photographed using MVX10 microscope (objective: 1×/1; 22°C; medium: PBS; Camera: Hamamatsu ORCA-03G; cellSens Dimension Version 1.4 software Olympus). Capillary-like structures were quantified by automatic counting in duplicate using the AngioQuant Version 1.33 software.³⁰

Cell migration assays

Boyden chambers with 5-µm pore polycarbonate filters (Costar Corning) were coated on both sides with 0.1% gelatin were used for cell migration assays. A total of 2.5×10^4 HUVECs suspended in EBM-2 containing 0.25% BSA were seeded in the upper compartment of the Boyden chamber. The lower compartment was filled with EBM-2 medium containing 0.25% BSA supplemented with either recombinant human VEGF-A (20 ng/mL), a combination of VEGF-A (20 ng/mL) and ProS (10 µg/mL), or with vehicle. After 4 hours, the upper surface of the filter was scraped with a cotton swab, and cells that migrated to the lower surface of the filters were fixed in methanol and labeled using eosin-hematoxylin stain. Cells were photographed using a Zeiss microscope (objective 20×; medium: Mowiol; Zeiss) and counted on 15 random fields using ImageJ Version 1.39n software (National Institutes of Health).

BrdU incorporation assay

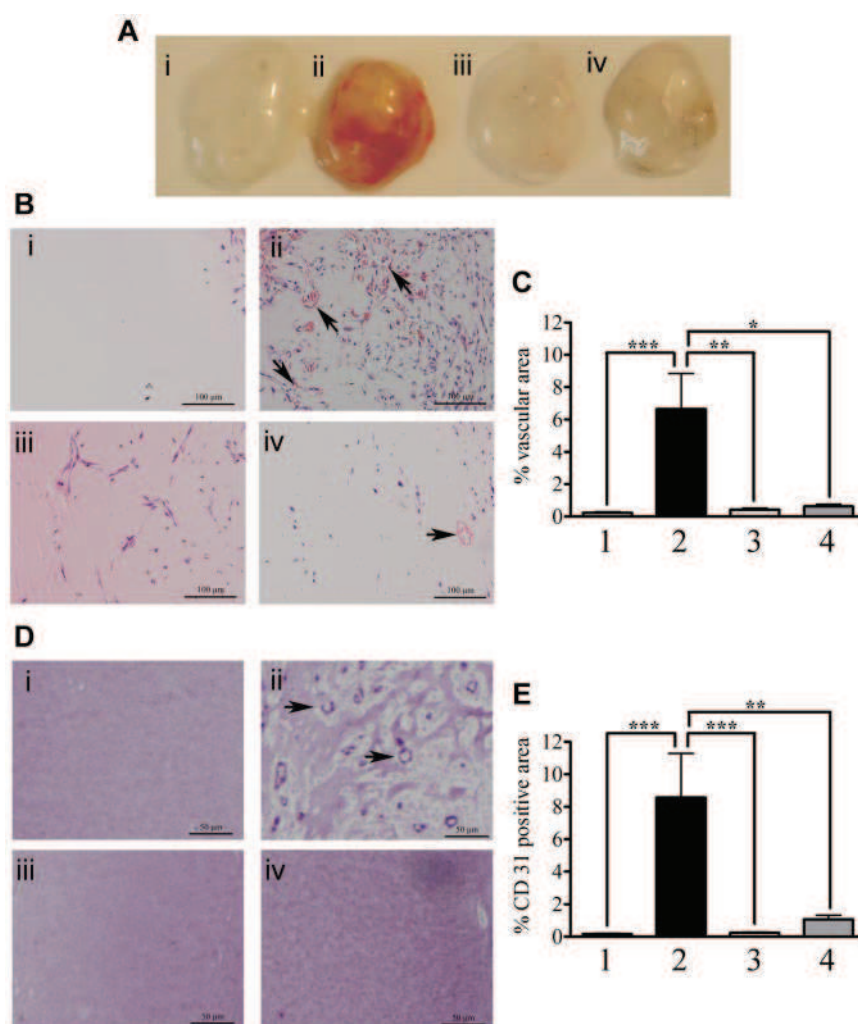
BrdU incorporation assay was used to monitor the mitogenic effects of the factors under study. HUVECs were first plated in 96-well plates at a density of 6×10^3 cells/well in EGM-2 and after 24 hours were shifted to EBM-2 and exposed to the factors under study at the indicated concentrations for 24 hours. SHP2 phosphatase inhibitor NSC87877 was used at 100 µM and added 3 hours before exposing cells to VEGF-A or human ProS. Anti-ProS antibody (Dako Denmark) was used at 40 µg/mL and was incubated with ProS for 1 hour at 4°C before their addition to EC cultures. BrdU incorporation rate was measured using Cell Proliferation ELISA, BrdU chemiluminescent kit (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions.

Silencing through RNA interference

To inhibit Tyro3, Axl, or Mer expression, RNA interference silencing was performed using siPORT Amine transfection agent (Ambion) according to the manufacturer's instructions. All double-stranded siRNAs were purchased from Ambion. Sequences are shown in supplemental Table 1 (available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). HUVECs were first plated in 6-well plates at a density of 2×10^5 cells/well in EGM-2 medium and then after 24 hours were transfected with 5 or 50 nM siRNA against Tyro3, Axl, or Mer or nontargeting siRNA. Depending on the assays used, controls were siPORT amine-transfected cells (vehicle) or cells that were not transfected. Cells harvested 24 and 48 hours after transfection were used to evaluate RNA and protein expression and BrdU incorporation.

Figure 1. Human ProS inhibits Matrigel vascularization in vivo.

(A) Matrigel plugs obtained from mice that were injected subcutaneously in the flank, with 0.4 mL of Matrigel alone (lane 1, control), Matrigel containing a mixture of proangiogenic factors (400 ng/mL bFGF, 400 ng/mL VEGF-A, and 50 units/mL heparin, plug 2) or human ProS at 25 μ g/mL (plug 3) or a mixture of proangiogenic factors (bFGF at 400 ng/mL, VEGF-A at 400 ng/mL, heparin at 50 units/mL) supplemented with 25 μ g/mL human ProS (plug 4). (B) Representative micrographs of hematoxylin and eosin-stained sections of Matrigel plugs under the experimental conditions; Matrigel alone (i, control), Matrigel containing a mixture of proangiogenic factors (ii, 400 ng/mL bFGF, 400 ng/mL VEGF-A, and 50 units/mL heparin) or human ProS at 25 μ g/mL (iii) or a mixture of proangiogenic factors (bFGF at 400 ng/mL, VEGF-A at 400 ng/mL, and heparin at 50 units/mL) supplemented with 25 μ g/mL ProS (iv). The arrows indicate vascular structures with lumens and red blood cells. (C) Quantification of vascular structures with lumens and red blood cells within Matrigel sections. (D) Representative micrographs of CD31 immunostaining of Matrigel plugs under the various experimental conditions; Matrigel alone (i, control), Matrigel containing a mixture of proangiogenic factors (ii, 400 ng/mL bFGF, 400 ng/mL VEGF-A, and 50 units/mL heparin) or human ProS at 25 μ g/mL (iii) or a mixture of proangiogenic factors (bFGF at 400 ng/mL, VEGF-A at 400 ng/mL, and heparin at 50 units/mL) supplemental with 25 μ g/mL ProS (iv). The arrows indicate blood vessel stained with CD31. Quantifications were performed from Matrigel plugs obtained from 3 independent experiments. Within each experiment and for each experimental condition, 3 individual plugs implanted in individual animals were analyzed. From each Matrigel plug, 3 sections were stained and analyzed. Results are expressed as percentage vascular area (C) or percentage CD31-positive area (E) \pm SEM, using Fiji-win32 software. *** P < .001. ** P < .01. * P < .05.



Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA XS kit (Machery-Nagel). Reverse transcription was performed with SuperScript II (Invitrogen) from 2 μ g of total RNA according to the manufacturer's instructions. Gene expression was assessed relative to GAPDH by quantitative real-time PCR with the GeneAmp 7000 Sequence Detection System and SYBR Green chemistry (Applied Biosystems). Human GAPDH, Tyro3, Axl, and Mer primer sequences are shown in supplemental Table 2. Sensitivity and specificity of each primer couple used were tested as shown in supplemental Figure 1. Amplicons were sequenced directly using the ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) and ABI PRISM 310 automatic sequencer.

Western blotting

HUVECs were plated in 12-well plates at a density of 1×10^5 cells/well in EGM-2 medium, and then after 24 hours cells were allowed to grow in EGM-2. After 4 days, cells were exposed to the factors under study at the indicated concentrations and for the specified durations. Cells were collected by scraping and then lysed with Laemmli reducing buffer. Equivalent amounts of protein for each sample were analyzed by SDS-PAGE transferred onto PVDF membranes (Millipore) and probed with the following primary antibodies: anti-Axl, anti-phospho-Erk 1/2 Thr 202/Tyr 204, anti-Erk 1 (all from Santa Cruz Biotechnology); anti-phospho-Mer, anti-mouse Mer 101-AP (all from FabGennix); anti-human Mer (Abcam); anti-actin (Sigma-Aldrich); anti-phospho-Akt Ser⁴⁷³, anti-Akt, anti-phospho-SHP2 Tyr⁵⁴², anti-SHP2 anti-phospho-VEGFR2 Tyr¹¹⁷⁵ and Tyr⁹⁹⁶ or anti-VEGFR2 all from Cell Signaling (Cell Signaling Technology); and

anti-GAPDH (HyTest). Immunodetection was performed using chemiluminescent substrate ECL Plus (Amersham) and LAS-3000 imaging system (Fujifilm). Intensity of bands was quantified using Scion Image Version Alpha 4.0.3.2 software (Scion Corporation). Three independent experiments were done in 12-well plates. In each experiment, 3 independent wells (triplicates) received the specified agent. In total, for each experimental point, 9 cells extracts (corresponding to 9 different wells) were analyzed.

Statistical analysis

Data obtained from at least 3 independent experiments, each in triplicate unless otherwise specified, were expressed either as mean values or percentages of control values \pm SD or SEM depending on the experiments performed. When indicated, statistical significance between data groups was determined by ANOVA using Prism Version 5 software (GraphPad) and considered to be significantly different at P < .05.

Results

Human ProS inhibits angiogenesis in vivo

We evaluated possible effects of human ProS on angiogenesis using the in vivo Matrigel plug assay (Figure 1A). Mice were injected, subcutaneously in the flank, with either Matrigel alone (control, plug 1) or with Matrigel containing a mixture of proangiogenic factors (bFGF and VEGF-A at 400 ng/mL) in the absence (plug 2) or presence (plug 4) of 25 μ g/mL human ProS or with

Matrigel containing only 25 $\mu\text{g/mL}$ human ProS (plug 3). After a week, Matrigel plugs were removed and analyzed. As expected, the presence of a mixture of proangiogenic factors (bFGF and VEGF-A) promoted angiogenesis (plug 2) compared with Matrigel alone (plug 1). Human ProS alone did not promote angiogenesis (plug 3), but it drastically inhibited angiogenesis induced by the mixture of proangiogenic factors (plug 4), suggesting that, under these experimental conditions, human ProS antagonized the effects of proangiogenic growth factors. Hematoxylin and eosin staining of Matrigel sections (Figure 1B) as well as quantification of vascular structures with lumens containing red blood cells (Figure 1C) confirmed a potent inhibitory effect of ProS on angiogenic factor- (bFGF and VEGF-A) induced Matrigel vascularization (Figure 1Bii compared with Figure 1Biv). Although ProS alone (Figure 1Biii) promoted cell recruitment to the Matrigel, it did not however induce the formation of vascular structures with lumens and red blood cells (Figure 1Biii) as confirmed by quantification analysis (Figure 1C) and by the absence of a red color in the Matrigel plug (Figure 1A, plug 3). Furthermore, CD31 staining (Figure 1D) and its quantification (Figure 1E) confirmed the presence of vascular structures in plugs treated with proangiogenic factors (Figure 1Dii) and their absence in plugs treated with proangiogenic factors and ProS (Figure 1Div).

In vitro morphogenesis assays are considered as the closest to in vivo angiogenesis as they recapitulate several cellular events leading to vessel formation.²⁹ ECs cultured on extracellular matrix preparations, such as Matrigel, spontaneously differentiate into capillary-like structures.²⁹ To ascertain further the inhibitory effect of ProS on angiogenesis, we next tested its effects in an in vitro morphogenesis assay in which human ECs were cultured on Matrigel. Typical capillary-like structures, formed by ECs cultured on Matrigel, for 24 hours, are represented in Figure 2Ai (by arrows, control). As expected, the formation of capillary-like structures was abolished in the presence of 10 $\mu\text{g/mL}$ endostatin (Figure 2Aiii), a well-known angiogenesis inhibitor.²¹⁻²³ Human ProS significantly inhibited capillary-like structure formation at both 1 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 2Av, > 25% inhibition) and 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 2Avi, > 50% inhibition) but not at 0.25 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 2Aiv). In the presence of 10 $\mu\text{g/mL}$ human ProS, ECs were unable to form interconnected tubular networks and remained mostly as single cells. At the same concentration (10 $\mu\text{g/mL}$), albumin, a serum protein with a molecular weight similar to that of ProS, had no effect on capillary-like structures (Figure 2Aii). Figure 2B provides a quantification of the in vitro morphogenesis assay in which total tube lengths were determined using AngioQuant Version 1.33 software³⁰ and plotted as a function of the treatment. The data highlight that the inhibitory effects of 10 $\mu\text{g/mL}$ human ProS are comparable with those of the well-known angiogenesis inhibitor endostatin.²¹⁻²³ Supplemental Figure 2 shows that the ability of human ECs to form tubular networks was VEGF-A-dependent, as inferred by the suppression of this process by an antibody against VEGFR2. The angiogenic process in vivo (Figure 1) and the ability of ECs cultured on Matrigel to form capillary-like structures (supplemental Figure 2) were both dependent on VEGF-A and were inhibited by human ProS. Therefore, we next assessed the ability of human ProS to interfere with VEGF-A-induced VEGFR2 signaling, EC proliferation, and migration.

Human ProS inhibits VEGF-A-induced EC proliferation, migration, and VEGF receptor signaling.

VEGF-A is a potent mitogen for ECs, and this mitogenic effect contributes to its overall angiogenic actions on ECs.²¹⁻²⁴ Therefore,

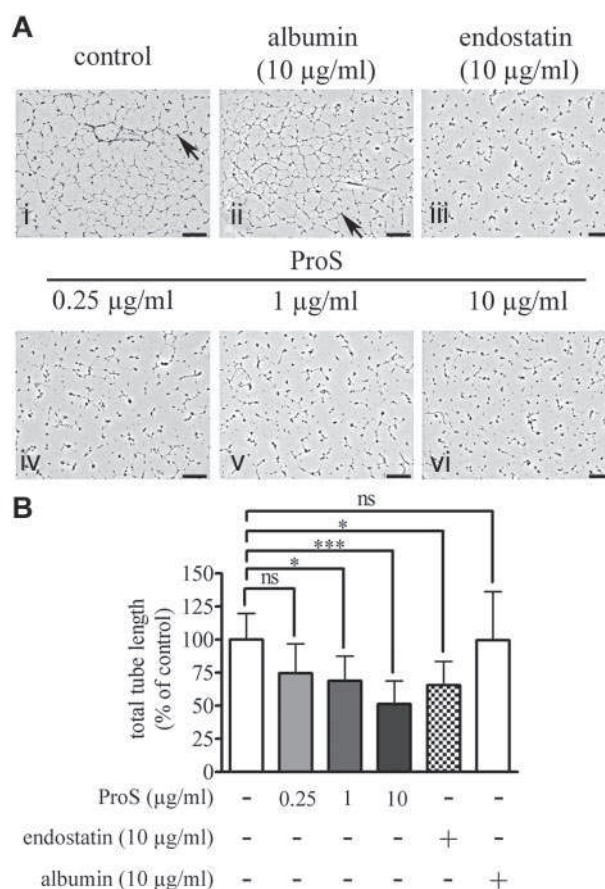


Figure 2. Human ProS inhibits the capacity of EC to form capillary-like networks in vitro. (A) The in vitro morphogenesis assay. ECs (10^5 cells/well) were cultured for 24 hours in EBM-2 medium containing 0.5% FCS in 24-well plates coated with Matrigel containing the indicated concentrations of human ProS, endostatin, or albumin. Cells were then fixed and the cell 3-dimensional organization was photographed using a MVX10 microscope. On the pictures, arrows indicate examples of tube formation, and each black scale represents 1 mm length. (B) The quantification of total tube length of capillary-like structures by automatic counting using the AngioQuant Version 1.33 software. Data from 4 independent experiments, each in duplicate, are expressed as percentages of control values from untreated cells \pm SD. *** $P < .001$. * $P < .05$. ns indicates not significant.

using the BrdU incorporation assay, we monitored the ability of human ProS to interfere with VEGF-A-induced proliferation in cultured ECs. Recombinant human VEGF-A at 20 ng/mL induced an increase in BrdU incorporation in ECs, which, as expected, was inhibited in the presence of 10 $\mu\text{g/mL}$ of the known antiangiogenic factor endostatin²¹⁻²³ (Figure 3A). Human ProS at 10 $\mu\text{g/mL}$ significantly inhibited VEGF-A-induced BrdU incorporation but did not abolish it. To ascertain that the observed ProS effects are not the result of contaminants in the commercial purified ProS preparation, we tested the effects of ProS on VEGF-A-induced BrdU incorporation in the presence of an anti-human ProS antibody. As shown in Figure 3A, the anti-ProS antibody, but not an irrelevant antibody from the same species used at the same concentration (Figure 3A), reversed the inhibitory effects of ProS on VEGF-A-stimulated BrdU incorporation. In addition, we tested purified ProS obtained from a different commercial source, and this also inhibited to a similar extent VEGF-A induced BrdU incorporation (supplemental Figure 3). Moreover, commercial purified ProS, from the 2 distinct sources, consistently induced a drastic inhibition of Matrigel plug vascularization as shown in Figure 1iv. A previous report ruled out the possibility of contaminant Gas6 being present in commercial purified human ProS preparations.¹³

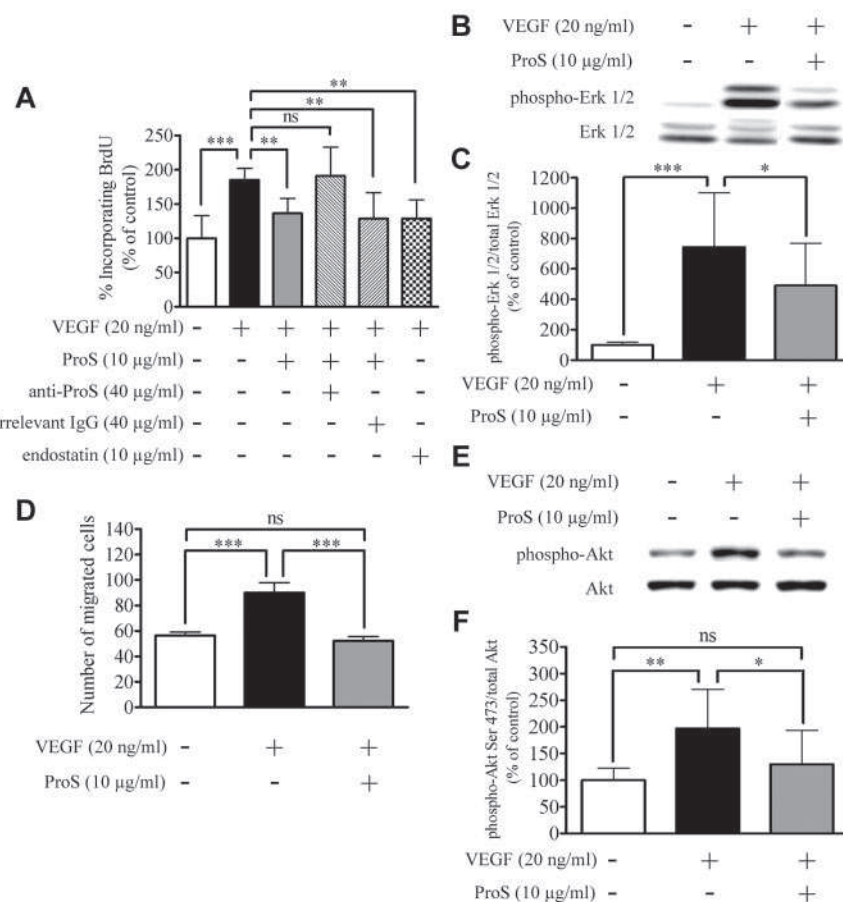


Figure 3. Human ProS inhibits VEGF-A-induced EC proliferation, migration, and signaling. (A) The percentage of BrdU incorporation induced by the indicated factors. ECs were seeded at a density of 6×10^3 cells/well in 96-well plates in growth factors containing medium for 24 hours, switched to a growth factor-depleted medium containing the indicated factors at the specified concentrations. BrdU incorporation was measured by ELISA. Data obtained from 3 independent experiments each in triplicates are expressed as percentages of control \pm SD. *** $P < .001$. ** $P < .01$. ns indicates not significant. (B-C) Western blot analysis of MAPK-Erk1/2 activation after cultured EC exposure to the indicated factors. Subconfluent EC cultures were exposed in a growth factor-depleted medium to ProS (10 µg/mL) or vehicle for 15 minutes and then stimulated with VEGF-A (20 ng/mL) for 5 minutes. Cell cultures were then lysed, and equivalent amounts of protein from each sample were resolved by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and probed with either antiphosphorylated Erk 1/2 or anti-Erk 1/2 antibodies. Band intensities were quantified and are represented in panel C as a percentage of control of the ratio of phosphorylated Erk1/2 over Erk1/2 \pm SD. Data were obtained from 4 independent experiments each in triplicates are expressed as percentages of control \pm SD. *** $P < .0001$. * $P < .05$. (D) The number of migrated ECs induced by the indicated factors. A total of 2.5×10^4 ECs were suspended in culture medium containing 0.25% BSA, seeded in the upper compartment, and separated from the lower compartment by a 5-µm pore size polycarbonate filter coated on both sides with 0.1% gelatin. The lower compartment contained the factor under study at the indicated concentrations diluted in 0.5 mL culture medium. After 4 hours of incubation, the upper surface of the filter was scraped, and cells present in the lower compartment were fixed, stained, migrated cells were photographed under the microscope, and counted on 15 fields using ImageJ Version 1.39o software. Data were obtained from 3 independent experiments, each in triplicates, expressed as percentages of control \pm SD. *** $P < .0001$. (E-F) Western blot analysis of Akt phosphorylation on Ser⁴⁷³ after cultured EC exposure to the indicated factors. Cell cultures were then lysed, and equivalent amounts of proteins from each sample were resolved by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and probed with either anti-Akt or anti-phospho-Ser⁴⁷³ Akt antibodies. Intensity of bands was quantified and are represented in panel F as a percentage of control of the ratio of phosphorylated Akt Ser⁴⁷³ over Akt \pm SD. Data were obtained from 3 independent experiments, each in triplicates, expressed as percentages of control \pm SD. ** $P < .01$. * $P < .05$. ns indicates not significant.

To examine further whether commercial purified human ProS used in our study contained human Gas6, we subjected this to Nano-liquid chromatography on a C18 column with a 20%-85% acetonitrile gradient coupled to mass spectrometry. The only peak observed (at 45% acetonitrile) corresponded to Human ProS mass. Finally, we used a more sensitive technique consisting of analyzing tryptic digest fragments of the protein preparations under study by nano-UPLC coupled to tandem mass spectrometry. We analyzed using this approach tryptic digest fragments obtained from commercial purified either human ProS or human Gas6. In commercial purified ProS, we detected 8 tryptic fragments that matched with human ProS sequence, and no tryptic fragments matching with human Gas6 sequence were detected (supplemental Figure 4). These results conclusively show that the observed activity of ProS could not be the result of contaminants in the purified ProS preparation.

Because the activation of the MAPK-Erk1/2 signaling is an essential step in mediating the mitogenic action of VEGF-A on ECs,³¹ we next analyzed by Western blotting MAPK-Erk1/2 activation by VEGF-A in the absence or presence of 10 µg/mL human ProS. Figure 3B and C shows that EC exposure to human ProS for 15 minutes before VEGF-A resulted in a marked inhibition of VEGF-A-induced Erk1/2 phosphorylation/activation. The angiogenic effect of VEGF-A is in part the result of its ability to stimulate EC motility, which is an important step of vascular pattern formation.³² Therefore, we evaluated the ability of human ProS to interfere with VEGF-A-induced ECs directional migration. At 10 µg/mL, human ProS inhibited chemotaxis induced by 20 ng/mL VEGF-A by $> 50\%$ (Figure 3D). The activation of PI3K signaling and Akt phosphorylation on Ser⁴⁷³ is a key event associated VEGF-A-induced EC migration.^{31,33} Therefore, we next analyzed, by Western blotting, Akt phosphorylation on Ser⁴⁷³ by

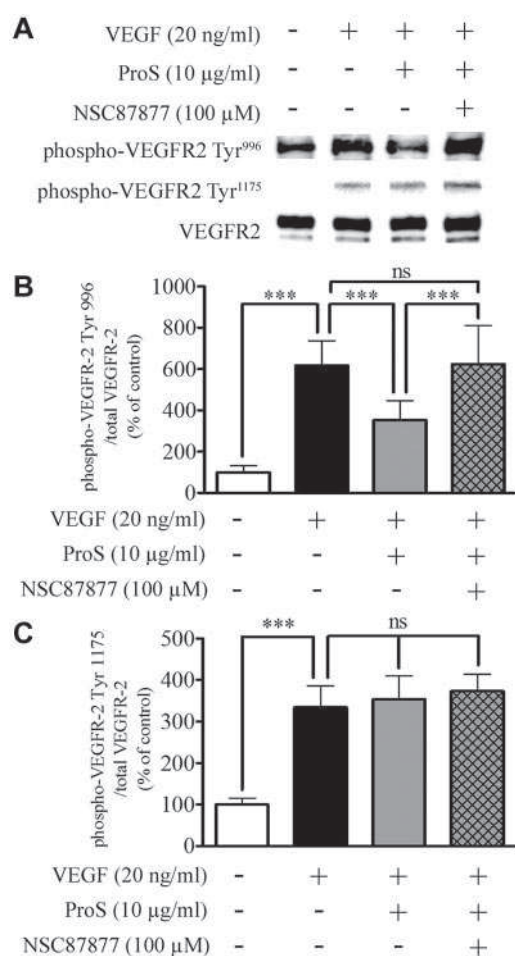


Figure 4. Human ProS inhibits VEGF-A–induced VEGFR2 activation at SHP2 sensitive sites. (A–B) Western blotting analysis of VEGFR2 phosphorylation after cultured EC exposure to the indicated factors. Subconfluent EC cultures were preincubated in a growth factor-depleted medium with either human ProS at the indicated concentrations or with vehicle for 15 minutes and then were exposed for 5 minutes to 20 ng/mL VEGF-A. Cells were exposed to the SHP2 inhibitor NSC 87877 at 100 µM for 3 hours or vehicle before ProS. Cell cultures were then lysed, and equivalent amounts of protein from each sample were resolved by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and probed with anti-phospho-VEGFR2 Tyr⁹⁹⁶, Tyr¹¹⁷⁵, or anti-VEGFR2 antibodies. The intensity of bands was quantified and is represented in panel C as a percentage of control of the ratio of phosphorylated VEGFR2 over VEGFR2 \pm SD. Data were obtained from 3 independent experiments (each in triplicates) expressed as percentages of control \pm SD. *** P < .001. ns indicates not significant.

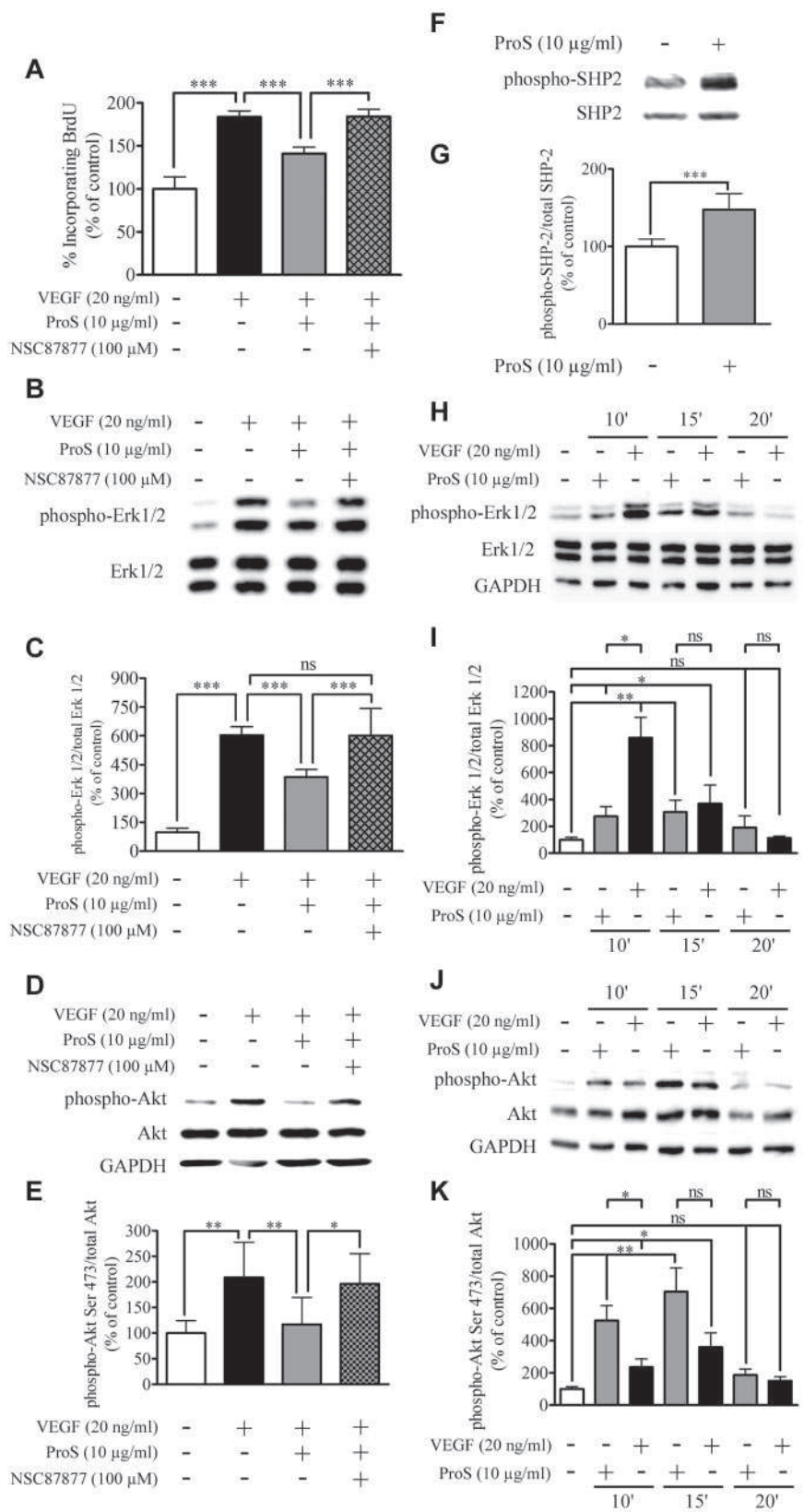
VEGF-A in the absence or presence of 10 µg/mL human ProS. As shown in Figure 3E and F, treatment of ECs with 10 µg/mL ProS for 15 minutes before VEGF-A resulted in a marked inhibition of VEGF-A–induced Akt phosphorylation on Ser⁴⁷³. To explore further the mechanisms by which human ProS antagonizes VEGF-A angiogenic signaling we analyzed, VEGFR2 phosphorylation in endothelial cells exposed to VEGF-A in the absence or presence of 10 µg/mL human ProS. Phosphorylation of Tyr⁹⁹⁶ and Tyr¹¹⁷⁵ residues, which are SHP2 sensitive and insensitive sites, respectively, was assessed.³⁴ Figure 4 shows that ProS inhibited VEGF-A–induced VEGFR2 tyrosine phosphorylation on Tyr⁹⁹⁶ but not Tyr¹¹⁷⁵. As shown in Figure 4, the SHP2 inhibitor NSC 87877^{25,35} suppressed the ProS inhibitory effect on VEGF-A–induced VEGFR2 phosphorylation. The SHP2 inhibitor NSC 87877 reversed the inhibitory effects of ProS on VEGF-A–induced EC proliferation (Figure 5A) and MAPK-Erk1/2 (Figure 5B–C) and Akt activation (Figure 5D–E). Figure 5F and G shows that ProS activated SHP2

phosphorylation. Therefore, SHP2 seems to play a key role in mediating ProS inhibitory effect on VEGF-A–induced signaling. We next analyzed whether ProS alone affected MAPK-Erk1/2 and Akt phosphorylation/activation. Figure 5H through K shows that ProS, on its own and independently from VEGF-A, activated both MAPK-Erk1/2 and Akt phosphorylation. Therefore, mobilization of both pathways (MAPK-Erk1/2 and Akt) by ProS alone may contribute, at least in part, to the inhibitory effect of ProS on VEGF-A–induced signaling in ECs. However, the reversal by the SHP2 inhibitor NSC 87877 of ProS inhibitory effect on VEGF-A–induced EC proliferation, VEGFR2 phosphorylation, and MAPK-Erk1/2 and Akt activation (Figure 5A–E) suggests that an SHP2-dependent mechanism also accounts for the overall inhibitory effect of ProS on VEGF-A–induced signaling, implying that the recruitment of SHP2 by the TAM receptor(s) is activated by ProS. Therefore, we next examined which TAM receptor(s) may be involved in ProS inhibitory effects on VEGF-A–induced EC activation.

The tyrosine kinase receptor Mer is activated by ProS and mediates its inhibitory effect on VEGF-A–induced EC proliferation

Human ProS is a potential agonist for the TAM family of receptor tyrosine kinases (Tyro3, Axl, and Mer).¹⁰ Real-time quantitative PCR analysis established that cultured EC expressed Axl, Tyro3, and Mer (Figure 6A; supplemental Table 2). In agreement with a previous report,¹⁸ Axl transcript levels were \sim 3-fold more abundant than those for Mer and in turn, Mer transcripts were \sim 11-fold more abundant than Tyro3 transcripts. Next, we used siRNA directed specifically against each of the 3 tyrosine kinase receptors. We show efficient and specific silencing of each transcript at both 24 and 48 hours after transfection, each of these siRNA efficiently target the transcript toward which it is specifically directed and does not interfere with the expression of 2 others (Figure 6B–C; supplemental Figure 5). Twenty-four to 48 hours are within the timing of the BrdU incorporation assay we use in our study, implying that under these conditions the ability of each of these siRNA to interfere with the inhibitory action of human ProS on VEGF-A–induced EC mitosis could be assessed. We next investigated whether any of these tyrosine kinase receptors were involved in the inhibitory effects of ProS on VEGF-A–induced EC activation. As shown in Figure 7A, silencing of either Axl or Tyro3 did not alter the inhibitory action of human ProS on VEGF-A–induced EC proliferation, whereas silencing of Mer completely suppressed it, suggesting that ProS by activating Mer tyrosine kinase receptor inhibits VEGF-A–mitogenic signaling. Furthermore, we used the in vitro morphogenesis assay described in Figure 2, which is considered as the closest to in vivo angiogenesis²⁹ to assess the consequences of Mer silencing on the ability of human ProS to inhibit capillary-like structure formation. Figure 7B and C show that Mer silencing suppressed ProS inhibitory action on capillary-like structure formation. Supplemental Figure 6 confirms that Mer siRNA induced under these experimental conditions efficient Mer silencing within 24 and 48 hours. Accordingly, treatment of endothelial cells with human ProS induced significant Mer receptor tyrosine phosphorylation within 10 minutes, which peaked at 15 minutes and declined at 20 minutes (Figure 7D–E). Furthermore, silencing of Mer prevented the activation of SHP2 by ProS (Figure 7F–G). Because the in vivo Matrigel plug assay was performed on mice using Human ProS, we verified and confirmed, using a mouse

Figure 5. Tyrosine phosphatase SHP2 is activated by ProS and is involved in the inhibitory activity of ProS on VEGF-A-mediated EC proliferation. (A) Changes in EC BrdU incorporation, in response to the indicated factors and effects of SHP2 inhibitor NSC8777 (100 μ M). ECs were seeded at a density of 6×10^3 cells/well in 96-well plates in growth factors containing medium for 24 hours, switched to a growth factor-depleted medium containing the indicated factors at the specified concentrations. BrdU incorporation was measured by ELISA. (B) Western blot analysis of MAPK-Erk1/2 activation state after pretreatment with NSC 8777 (100 μ M) for 3 hours before ProS stimulation for 15 minutes followed by VEGF-A stimulation for 5 minutes. (C) Intensity of bands was quantified and is represented as a percentage of control of the ratio of phosphorylated Erk1/2 over Erk1/2. (D) Western blot analysis of Akt activation state after pretreatment with NSC 8777 (100 μ M) for 3 hours before ProS stimulation for 15 minutes followed by VEGF-A stimulation for 5 minutes. (E) Intensity of bands was quantified and is represented as a percentage of control of the ratio of phosphorylated Akt over Akt. (F) Western blotting analysis of SHP2 phosphorylation subsequently to EC culture exposure to human ProS. Subconfluent EC cultures were exposed in a growth factor-depleted medium to 10 μ g/mL human ProS or vehicle for 15 minutes. Cell cultures were then lysed, and equal amounts of proteins were analyzed by Western blotting using either an anti-phospho SHP2 or anti-SHP2 antibody. (G) Intensity of bands was quantified and is represented as a percentage of control of the ratio of phosphorylated SHP2 over SHP2. (H) Western blot analysis of MAPK-Erk1/2 activation state after treatment with ProS (10 μ g/mL) for the indicated time. (I) Intensity of bands was quantified and is represented as a percentage of control of the ratio of phosphorylated Erk1/2 over Erk1/2. (J) Western blot analysis of Akt activation state after treatment with ProS (10 μ g/mL) for the indicated time. (K) Intensity of bands was quantified and is represented as a percentage of control of the ratio of phosphorylated Akt over Akt. (A-K) Data were obtained from 3 independent experiments (3 independent cell culture) in either 96-well plates (A) or 24-well plates (B-K), each either in triplicate wells (A-G) or in duplicates (H-K), expressed as percentages of control \pm SD. *** P < .001. ** P < .01. * P < .05. ns indicates not significant.



cell line and the Mer receptor tyrosine phosphorylation assay described above, that Human ProS does activate mouse Mer tyrosine kinase receptor (supplemental Figure 7). Altogether, these data suggest that, in human ECs, human ProS activates Mer

tyrosine kinase receptor, which in turn recruits/activates SHP2, which dephosphorylates VEGFR2 on Tyr⁹⁸, thereby inhibiting multiple VEGF-A-dependent angiogenesis-related events as illustrated in Figure 7H.

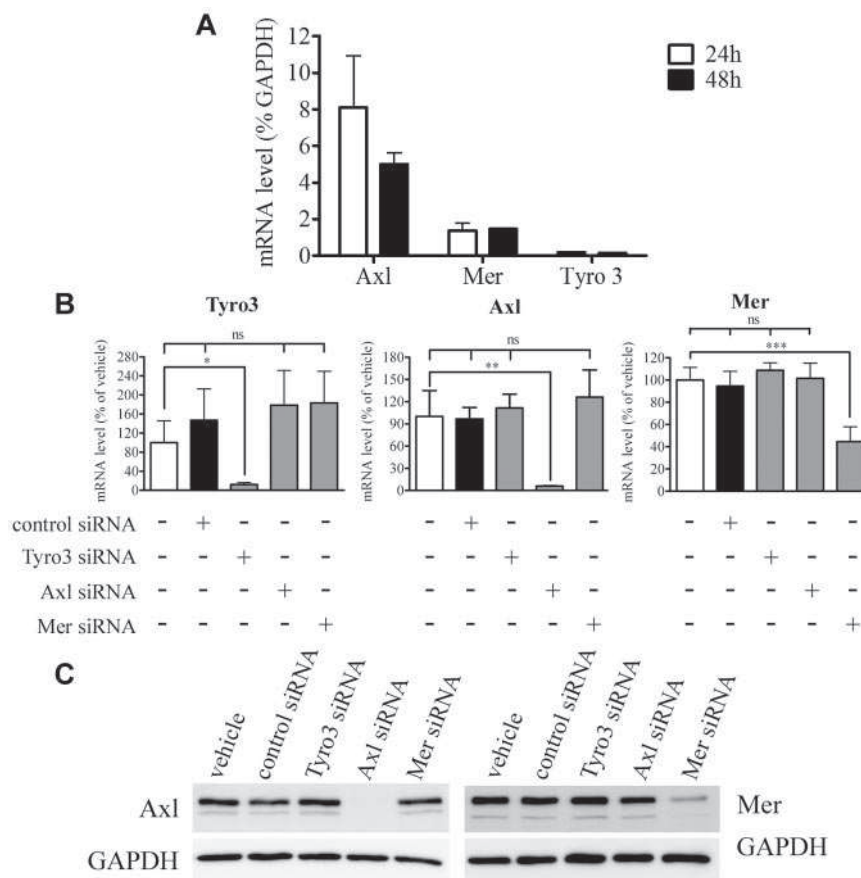


Figure 6. TAM receptor expression and siRNA knock-down validation. (A) Tyro3, Axl, and Mer gene transcript levels relative to that of GAPDH as determined by quantitative real-time PCR after 24 and 48 hours of EC culture in growth factor-containing medium. (B-C) The effectiveness and the specificity of targeted siRNA in silencing Tyro3, Axl, and Mer gene expression, real-time quantitative PCR 24 hours after siRNA transfection (B) or Western blot analysis 24 hours after siRNA transfection (C). EC cultures were transfected with either the specified siRNA used at 5nM for Tyro3 and Axl or at 50nM for Mer or with vehicle (5 μ L/well siPORT) or as a control with 50nM nontargeting siRNA. For panel B, cells were harvested 24 hours after transfection and total RNA extracted. Reverse transcription was performed using 2 μ g of total extracted RNA. Tyro3, Axl, and Mer gene expression was assessed relative to that of GAPDH by quantitative real-time PCR and is expressed as percentage of the same ratio in siPORT-transfected ECs. Data were obtained from 3 independent experiments each in triplicate \pm SD. *** P < .001. ** P < .01. * P < .05. ns indicates not significant. For panel C, equivalent amounts of protein from each sample were resolved by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and probed with anti-Mer, anti-Axl, or anti-GAPDH antibodies.

Discussion

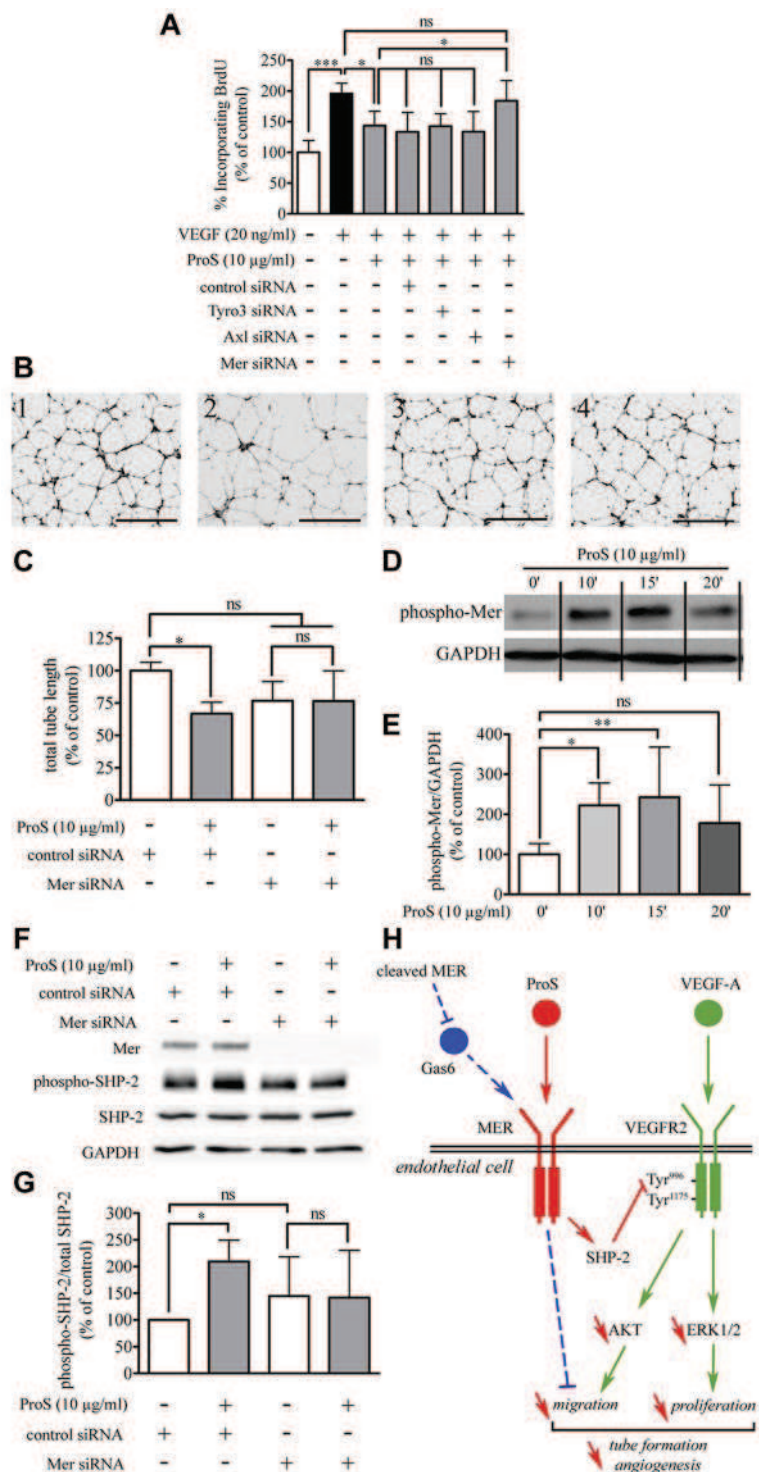
ProS, by acting as an agonist for the TAM family of receptor tyrosine kinases (Tyro3, Axl, and Mer),¹⁰ regulates a variety of cellular processes, ranging from cell proliferation,⁹ survival,¹⁴ phagocytic clearance of apoptotic cells,¹⁷ and the homeostatic regulation of the immune system.³⁶ The production of ProS at several extrahepatic sites, including the vasculature,^{7-9,37} suggests that, besides and independently of its role in blood coagulation, ProS may act as an autocrine/paracrine factor.

In the present study, we describe, for the first time to our knowledge, a human ProS inhibitory pathway, which impedes the angiogenic program activated by VEGF-A. We provide evidence that human ProS inhibits the vascularization of a Matrigel plug in vivo and the capacity of ECs to form capillary-like networks as well as VEGF-A-dependent EC migration, mitosis, and signaling (VEGFR2, MAPK-Erk1/2, and Akt phosphorylation) in vitro. Depending mainly on the cell type studied and the identity of the tyrosine kinase receptor involved, ProS exhibits several cell activities in different contexts. In the vascular system, it induces vascular smooth muscle cell proliferation⁹ and acts as a survival factor for brain endothelial cells.¹⁴ ProS circulates in human plasma at a concentration of ~ 25 μ g/mL, which is within the range (1-25 μ g/mL) we used in all our in vitro and in vivo assays. Because substantial amounts of ProS are produced by vascular wall components^{8,9} as well as by some cancer cells,^{38,39} the antiangiogenic effect of human ProS, we report in the present study, may constitute an autocrine/paracrine inhibitory mechanism for angiogenesis contributing thereby to a tuning balance between endogenous promoters and inhibitors of angiogenesis. Similarly to ProS,

angiostatin, which is a potent natural antiangiogenic factor, is produced by primary tumors.⁴⁰

Using TAM receptor gene silencing, we demonstrate that the tyrosine kinase receptor Mer mediates ProS inhibitory effects on VEGF-A activity. Because cytosolic protein tyrosine phosphatases containing Src homology domain-2 are potent regulators of intracellular pathways activated by many tyrosine kinase receptors, we tested the hypothesis that SHP2 could be recruited to mediate an inhibitory effect of ProS-Mer axis on VEGF-A-induced EC mitosis. Both indirect (ProS dephosphorylates VEGFR-2 on Tyr⁹⁹⁶ but not Tyr¹¹⁷⁵ residues, which are SHP2 sensitive and insensitive sites, respectively) and direct (activation of SHP2 by ProS and the suppression of this activation by Mer silencing) observations provide the first evidence, to our knowledge, that human ProS/Mer axis recruits the tyrosine phosphatase SHP2. Human ProS induced tyrosine phosphorylation of both Mer receptor and SHP2, and Mer silencing suppressed the ability of ProS to induce SHP2 phosphorylation and significantly altered its inhibitory action on VEGF-A-induced EC proliferation and capillary-like structure formation (Figure 7). It was reported that Axl stimulation by the structural homolog of ProS, Gas6, activates SHP2, thereby inhibiting VEGF-A-dependent activation of both VEGFR2 and the angiogenic program in vascular endothelial cells.²⁹ More recently, Ruan and Kazlauskas demonstrated that VEGF-A-dependent activation of VEGFR2 and recruitment of Src family kinases engages the receptor tyrosine kinase Axl to trigger ligand-independent autophosphorylation that promotes activation of Akt.⁴¹ The evidence we provide for the existence of a ProS/Mer/SHP2 axis, which inhibits VEGF-A-mediated VEGFR2, MAPK Erk1/2, and Akt activation, suggests that, besides Axl, Mer tyrosine kinase receptors is also a

Figure 7. Mer silencing suppresses both ProS-induced SHP2 activation and inhibition of VEGF-A-induced EC BrdU incorporation and tube formation. (A) Changes in BrdU incorporation resulting from silencing of Tyro3, Axl, or Mer gene expression. ECs were seeded at a density of 6×10^3 cells/well in 96-well plates in EGM-2 for 24 hours. Cells were then transfected with either the specified siRNA used either at 5nM for Tyro3 and Axl or at 50nM for Mer or with vehicle (0.5 μ L/well siPORT) or as a control with 50nM nontargeting siRNA. At 24 hours after transfection, cells were switched to EBM-2 containing the indicated factors at the specified concentrations. BrdU incorporation was measured by ELISA. Data obtained from 3 independent experiments (3 distinct independent cell culture 96-well plates) each in triplicate wells are expressed as percentages of the same ratio in siPORT-transfected ECs \pm SD. *** $P < .001$. * $P < .05$. ns indicates not significant. (B) The in vitro morphogenesis assay. ECs (2×10^5 cells/well) were cultured for 24 hours in complete medium and then transfected with 5nM of either Mer or control siRNA. At 24 hours after transfection, cells were harvested and seeded at the density of 10^5 cells/well in EBM-2 containing 0.5% FCS and 20 ng/mL VEGF-A, in 24-well plates coated with Matrigel containing either human ProS (20 μ g/mL) or vehicle. The cell 3-dimensional organization was photographed using a MVX10 microscope. Black scale bar on pictures represents 100 μ m length. (C) Quantifications of total tube length of capillary-like structures by automatic counting using the AngioQuant software. Data obtained from 3 independent experiments each in triplicate are expressed as percentages of control \pm SD. * $P < .05$. ns indicates not significant. (D) Mer receptor tyrosine phosphorylation after treatment with ProS (10 μ g/mL) for the indicated time. GAPDH was used as loading control. Because the data were obtained from 3 independent experiments each in triplicate and only 1 representative result for each time point is depicted in the figure, vertical lines have been inserted to indicate repositioned gel lanes. The intensity of bands was quantified and is represented in panel E as a percentage of control of the ratio of phosphorylated Mer over GAPDH \pm SD. ** $P < .01$. * $P < .05$. ns indicates not significant. (E) Western blotting analysis of Mer receptor expression and changes in EC response to ProS, in term of SHP2 activation, after silencing of Mer. (F) The intensity of bands was quantified and is represented as a percentage of control of the ratio of phosphorylated SHP2 over SHP2; some error bars were too small to be visible. Data obtained from 4 independent experiments each in duplicate are expressed as percentages of control \pm SD. * $P < .05$. ns indicates not significant. (G) The proposed mechanism through which ProS interferes with VEGF-A-induced VEGFR2 signaling. VEGF-A triggers VEGFR2, Akt, and Erk 1/2 activation, leading to EC migration proliferation and subsequently to vascular tube formation (in green). ProS activates its tyrosine kinase receptor Mer, leading to SHP-2 activation, which dephosphorylates VEGFR2 on the SHP2-sensitive site Tyr⁹⁹⁶, thereby inhibiting VEGFR2 recruitment of Akt and Erk 1/2 pathways and subsequently VEGFR2 induced EC migration and proliferation necessary for tube formation and angiogenesis (in red). A recent report⁴⁵ has described that, similarly to ProS, its structural homolog Gas6 activates Mer tyrosine kinase receptor, leading to the inhibition of EC migration and angiogenesis (in blue). Tumor cells release soluble Mer, which acts as a decoy receptor for Gas6, thereby reducing the suppressive effects of Gas6 on endothelial cell recruitment.



key regulator of VEGF-A-dependent angiogenesis. The occurrence of ligand-independent autophosphorylation of Mer tyrosine kinase receptor that may regulate Akt, similarly to that reported for Axl,⁴¹ remains to be examined.

Uehara and Shacter demonstrated that disulfide-linked ProS oligomers stimulate phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages by inducing the dimerization and activation of macrophage Mer tyrosine kinase receptor.⁴² This study also established that phosphatidylserine exposed on the outer surface of apoptotic cells provides a scaffold for intermolecular ProS interactions and its oxidative oligomerization.⁴² Free ProS stimulates

phagocytosis of apoptotic cells, whereas ProS in complex with C4BP¹ has an inhibitory effect on this process, implying that on macrophages C4BP inhibits the interaction between ProS and its receptors.⁴³ It will be interesting in the future to investigate whether ProS oligomerization is essential for its presently described new role in inhibiting VEGF-A-induced EC activation and angiogenesis, whether phosphatidylserine exposed on the outer surface of apoptotic cells that may be present within EC cultures in vitro or within the vessel wall in vivo provides a scaffold for intermolecular ProS oxidative oligomerization and how C4BP may be affecting this newly described role of ProS on angiogenesis. Sather et al

described the presence of a soluble form of Mer tyrosine kinase receptor, consisting of its extracellular domain, produced by proteolytic cleavage, and found in human plasma and cell culture media.⁴⁴ While the present report was under preparation, a study by Png et al⁴⁵ convincingly demonstrated that Mer tyrosine kinase receptor is the endothelial receptor that mediates the Gas6-suppressive effect on metastatic endothelial recruitment and metastatic angiogenesis, and that soluble Mer tyrosine kinase receptor from metastatic cells acts as a decoy receptor for Gas6, thereby reducing the suppressive effects of Gas6 on endothelial cell recruitment. The present report, by revealing that Mer tyrosine kinase mediates ProS inhibitory action on VEGF-A angiogenic activities, does not only confirm some of the findings of the study by Png et al⁴⁵ but also extends them by identifying (1) the activation of Mer tyrosine kinase receptor by ProS as an additional mechanism for inhibiting endothelial cell recruitment and angiogenesis, and (2) SHP2 phosphatase as an intracellular mediator of ProS/Mer antiangiogenic action (Figure 7H).

ProS and Gas6 have a strong amino acid sequence similarity, a similar domain organization, share some activities, but have many differences in functions. ProS plays a critical role as an anticoagulant,¹⁻⁵ whereas Gas6 has no anticoagulant function but plays an important role in platelet aggregation.⁴⁶ Human Gas6 is a potent, whereas human ProS is a weak, ligand for TAM tyrosine kinase receptors.^{47,48} The plasma concentration of Gas6 is ~ 20 ng/mL, meaning that it is ~ 1000-fold lower than that of ProS.⁴⁹ Therefore, differences between Gas6 and ProS with regards to their affinity for TAM RTKs^{47,48} may be compensated by differences between Gas6 and ProS both in term of their plasma concentration and their spatiotemporal expression, suggesting that, depending on the context, both Gas6 and ProS could activate TAM tyrosine kinase receptors and regulate specific cellular processes.

We also demonstrate in the present study that ProS inhibits VEGFA-induced VEGFR2, Erk1/2 MAPK, and Akt activation; the 2 later pathways may be primarily linked to ProS inhibitory action on VEGF-A mitogenic and chemotactic effects on ECs, respectively. Alternatively, the inhibitory action of ProS on VEGF-A induced MAPK-Erk1/2 and Akt activation may relate to the regulation by ProS of additional VEGF-A-dependent events, such as vascular permeability. In this context, the presently described inhibitory effect of ProS on angiogenesis and EC motility along with its known survival effect on ECs¹⁴ may seem contradictory. However, taking into account that migrating cells could undergo apoptosis by anoikis,⁵⁰ inhibition of EC motility by ProS unraveled in the present study may be part of integrated effect of ProS to promote EC survival and vessel wall stability. The recent finding of defects in vessel development and function in mice embryos from ProS gene mutants or from mice in which *ProS* gene was conditionally deleted in vascular smooth muscle reinforces the hypothesis of a crucial role of ProS in vessel wall stability.⁴ The

observation that ProS/Mer axis inhibits macrophage scavenger receptor A-mediated AcLDL uptake and scavenger receptor A expression in human monocyte-derived macrophages,¹³ provided the basis for a regulatory role of ProS/Mer in atherogenesis and atherothrombosis. Therefore, besides the direct role of ProS/Mer axis on endothelial cells, revealed in the present report, ProS/Mer axis, by acting on other components of the vessel wall,¹³ may also play an important role for its injury and repair.

Besides its potential for being used as part of an antiangiogenic therapy in human cancers and other angiogenesis-dependent disorders, the antiangiogenic effect of ProS/Mer axis we report in the present study may also form the framework of future studies aiming at elucidating further the involvement of ProS produced within the vessel wall in vascular development, control of vessel barrier function, and vessel wall integrity.

Acknowledgments

The authors thank A. Cantereau and IMAGEUP facility of the University of Poitiers for microscopy; Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire, Amboise for Matrigel section staining; and W. Kaaki and PROTEOMEUP facility of the University of Poitiers for NanoUP-LC and mass spectrometry study.

This work was supported by La Ligue Contre le Cancer Grand Ouest (Comités de la Vienne, Deux-Sèvres), and Retina France. S.F. holds a PhD fellowship from the French Ministry for Education and Science.

Authorship

Contribution: S.F. performed the research, analyzed results, made the figures, and contributed to writing the manuscript; A.M. and M.P. performed the research and analyzed results; J.C., J.T., and C.S. performed experiments, analyzed results, and made the figures; C.K. and S.M.K. performed experiments, analyzed results, and contributed to writing the manuscript; O.B. initiated and designed the research project, analyzed results, and wrote the manuscript; and all authors contributed to the design and analysis of experiments.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Omar Benzakour, Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, Centre National de la Recherche Scientifique FRE 3511, Université de Poitiers, Bât. B36, 1 rue Georges Bonnet-BP 633, 86022 Poitiers Cedex, France; e-mail: omar.benzakour@univ-poitiers.fr.

References

- Dahlback B. The tale of protein S and C4b-binding protein, a story of affection. *Thromb Haemost.* 2007;98(1):90-96.
- Saller F, Villoutreix BO, Amelot A, et al. The gamma-carboxyglutamic acid domain of anticoagulant protein S is involved in activated protein C cofactor activity, independently of phospholipid binding. *Blood.* 2005;105(1):122-130.
- van't Veer C, Hackeng TM, Biesbroeck D, Sixma JJ, Bouma BN. Increased prothrombin activation in protein S-deficient plasma under flow conditions on endothelial cell matrix: an independent anticoagulant function of protein S in plasma. *Blood.* 1995;85(7):1815-1821.
- Burstyn-Cohen T, Heeb MJ, Lemke G. Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *J Clin Invest.* 2009;119(10):2942-2953.
- Garcia de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 2007;98(3):543-556.
- Fair DS, Marlar RA. Biosynthesis and secretion of factor VII, protein C, protein S, and the protein C inhibitor from a human hepatoma cell line. *Blood.* 1986;67(1):64-70.
- Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):327-336.
- Fair DS, Marlar RA, Levin EG. Human endothelial cells synthesize protein S. *Blood.* 1986;67(4):1168-1171.
- Benzakour O, Kanthou C. The anticoagulant factor, protein S, is produced by cultured human vascular smooth muscle cells and its expression is up-regulated by thrombin. *Blood.* 2000;95(6):2008-2014.

10. Stitt TN, Conn G, Gore M, et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*. 1995;80(4):661-670.
11. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*. 2007; 131(6):1124-1136.
12. Hall MO, Obin MS, Heeb MJ, Burgess BL, Abrams TA. Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2005;81(5):581-591.
13. Liao D, Wang X, Li M, Lin PH, Yao Q, Chen C. Human protein S inhibits the uptake of AcLDL and expression of SR-A through Mer receptor tyrosine kinase in human macrophages. *Blood*. 2009; 113(1):165-174.
14. Zhu D, Wang Y, Singh I, et al. Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor. *Blood*. 2010;115(23):4963-4972.
15. Guo H, Barrett TM, Zhong Z, et al. Protein S blocks the extrinsic apoptotic cascade in tissue plasminogen activator/N-methyl D-aspartate-treated neurons via Tyro3-Akt-FKHL1 signaling pathway. *Mol Neurodegener*. 2011;6 13.
16. Prasad D, Rothlin CV, Burrola P, et al. TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci*. 2006;33(1):96-108.
17. Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol*. 2003;4(1):87-91.
18. Tjwa M, Bellido-Martin L, Lin Y, et al. Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes. *Blood*. 2008;111(8):4096-4105.
19. Collett G, Wood A, Alexander MY, et al. Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ Res*. 2003;92(10): 1123-1129.
20. Melaragno MG, Wuthrich DA, Poppa V, et al. Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats. *Circ Res*. 1998; 83(7):697-704.
21. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000;6(4):389-395.
22. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9(6):685-693.
23. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-676.
24. Hao Q, Wang L, Zhao ZJ, Tang H. Identification of protein kinase D2 as a pivotal regulator of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *J Biol Chem*. 2009;284(2):799-806.
25. Chen L, Sung SS, Yip ML, et al. Discovery of a novel shp2 protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Mol Pharmacol*. 2006;70(2):562-570.
26. Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest*. 2004;114(7):898-907.
27. Grote K, Schuett H, Salguero G, et al. Toll-like receptor 2/6 stimulation promotes angiogenesis via GM-CSF as a potential strategy for immune defense and tissue regeneration. *Blood*. 2010; 115(12):2543-2552.
28. Primeau AJ, Rendon A, Hedley D, Lilje L, Tannock IF. The distribution of the anticancer drug doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2005;11(24):8782-8788.
29. Gallicchio M, Mitola S, Valdembrì D, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor. *Blood*. 2005;105(5):1970-1976.
30. Niemisto A, Dunmire V, Yli-Harja O, Zhang W, Shmulevich I. Robust quantification of in vitro angiogenesis through image analysis. *IEEE Trans Med Imaging*. 2005;24(4):549-553.
31. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling: in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(5):359-371.
32. Rousseau S, Houle F, Huot J. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10(8):321-327.
33. Goetze S, Eilers F, Bungenstock A, et al. PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;293(5):1431-1437.
34. Sinha S, Vohra PK, Bhattacharya R, Dutta S, Sinha S, Mukhopadhyay D. Dopamine regulates phosphorylation of VEGF receptor 2 by engaging Src-homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2. *J Cell Sci*. 2009;122(18): 3385-3392.
35. Sylvest L, Bendiksen CD, Houen G. Phosphatase inhibitors with anti-angiogenic effect in vitro. *Appl*. 2010;118(1):49-59.
36. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*. 2001;293(5528):306-311.
37. Stern D, Brett J, Harris K, Nawroth P. Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the synthesis and release of protein S. *J Cell Biol*. 1986;102(5):1971-1978.
38. Wimmel A, Rohner I, Ramaswamy A, et al. Synthesis and secretion of the anticoagulant protein S and coexpression of the Tyro3 receptor in human lung carcinoma cells. *Cancer*. 1999;86(1): 43-49.
39. Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zawadzki R, Zimnoch L, Kisiel W. Expression of protein C (PC), protein S (PS) and thrombomodulin (TM) in human colorectal cancer. *Thromb Res*. 2010; 125(3):e71-e75.
40. Volm M, Mattern J, Koomagi R. Angiostatin expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2000;6(8):3236-3240.
41. Ruan GX, Kazlauskas A. Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt. *EMBO J*. 2012;31(7):1692-1703.
42. Uehara H, Shacter E. Auto-oxidation and oligomerization of protein S on the apoptotic cell surface is required for Mer tyrosine kinase-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol*. 2008;180(4):2522-2530.
43. Kask L, Trouw LA, Dahlback B, Blom AM. The C4b-binding protein-protein S complex inhibits the phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem*. 2004;279(23):23869-23873.
44. Sather S, Kenyon KD, Lefkowitz JB, et al. A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood*. 2007;109(3): 1026-1033.
45. Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature*. 2011;481(7380):190-194.
46. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med*. 2001;7(2):215-221.
47. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, et al. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996; 271(47):30022-30027.
48. Hafizi S, Dahlback B. Gas6 and protein S: vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J*. 2006;273(23):5231-5244.
49. Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlback B. Analysis of Gas6 in human platelets and plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(6):1280-1286.
50. Horbinski C, Mojesky C, Kyprianou N. Live free or die: tales of homeless (cells) in cancer. *Am J Pathol*. 2010;177(3):1044-1052.

Supplemental data to

The vitamin K-dependent anti-coagulant factor, protein S, inhibits multiple VEGF-A-induced angiogenesis events in a Mer- and SHP2-dependent manner

FRAINEAU Sylvain, MONVOISIN Arnaud, CLARHAUT Jonathan, TALBOT Julie, SIMONNEAU Claire, KANTHOU Chryso, KANSE Sandip M, PHILIPPE Michel and BENZAKOUR Omar

Supplementary data including:

- 2 tables (supplementary Table 1 and supplementary Table 2)**
- 7 figures numbered supplementary figures S1-S7**

Supplementary Table 1. siRNA sequences.

| siRNA target gene | siRNA sense | Primer Sequence (5' > 3') | Annealed Molecular weight |
|-------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|
| Tyro 3 | Forward | GAGCUUUACUUGUCUGCGAtt | 13400 |
| | Reverse | UCGCAGACAAGUAAAGCUCgg | |
| Axl | Forward | CAGCGAGAUUUUAUGACUAUtt | 13300 |
| | Reverse | AUAGUCAUAAAUCUCGCUGtt | |
| Mer | Forward | CAGUAGCCGUGUUAACGAAtt | 13400 |
| | Reverse | UUCGUUAACACGGCUACUGtt | |

Table 1 presents TAM (Tyro3, Axl, Mer) receptor siRNA sequences used for silencing in RNA interference experiments.

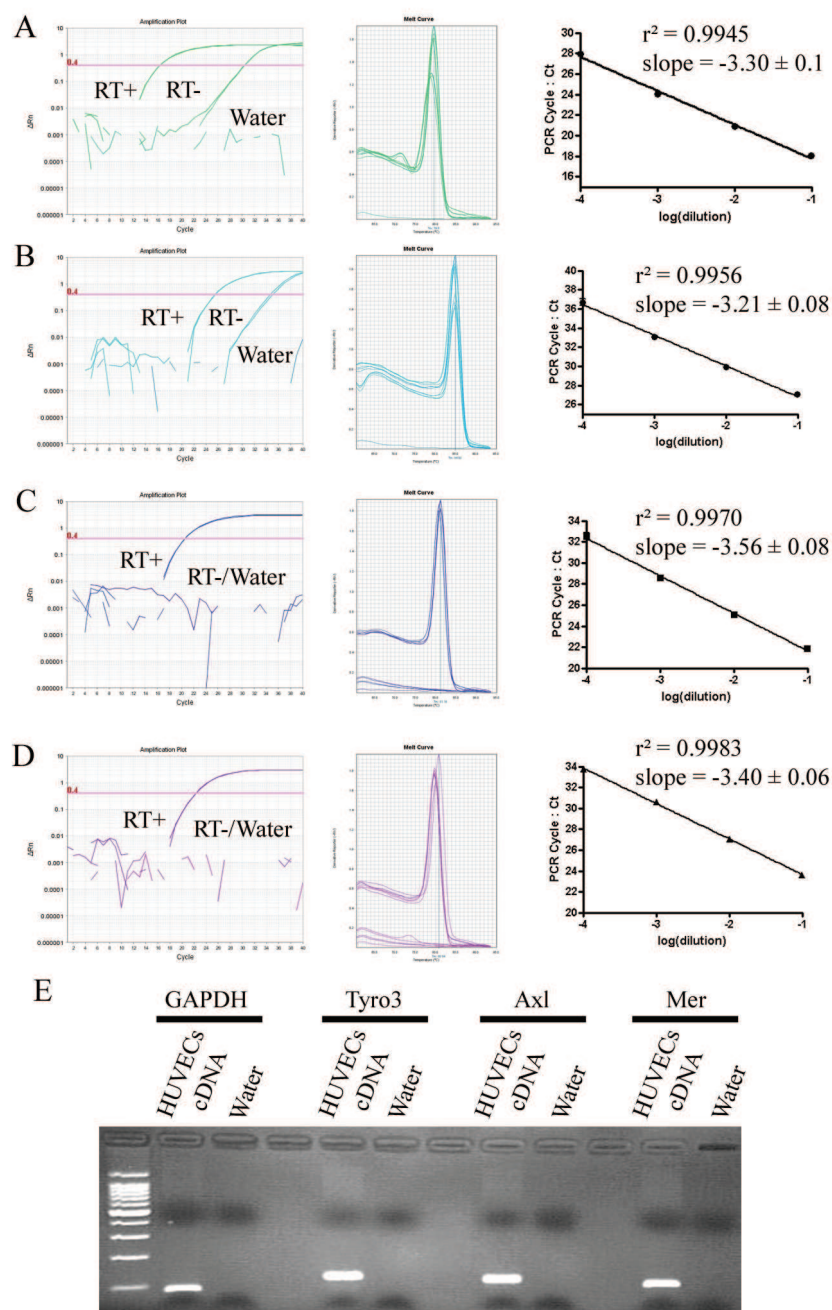
Supplementary Table 2. QPCR primer sequences.

| Gene | Primer sense | Primer Sequence (5' > 3') | Amplicon Size |
|----------------------------|--------------|---------------------------|---------------|
| GAPDH NM_002046 | Forward | TGCACCACCAACTGCTTAGC | 87 pb |
| | Reverse | GGCATGGACTGTGGTCATGAG | |
| Tyro 3 NM_006293 | Forward | GCAAGCCTTTGACAGTGTGTCATGG | 130 pb |
| | Reverse | GTTTCATCGCTGATGCCCAAGCT | |
| Axl NM_021913 | Forward | GTTTGGAGCTGTGATGGAAGGC | 120 pb |
| | Reverse | CGCTTCACTCAGGAAATCCTCC | |
| Mer NM_006343 | Forward | CAGGAAGATGGGACCTCTCTGA | 114 pb |
| | Reverse | GGCTGAAGTCTTTCATGCACGC | |

Table 2 presents primer sequences used for quantitative real-time PCR experiments.

Supplementary figure S1. Validation of qPCR primers used for quantitative real-time PCR experiments

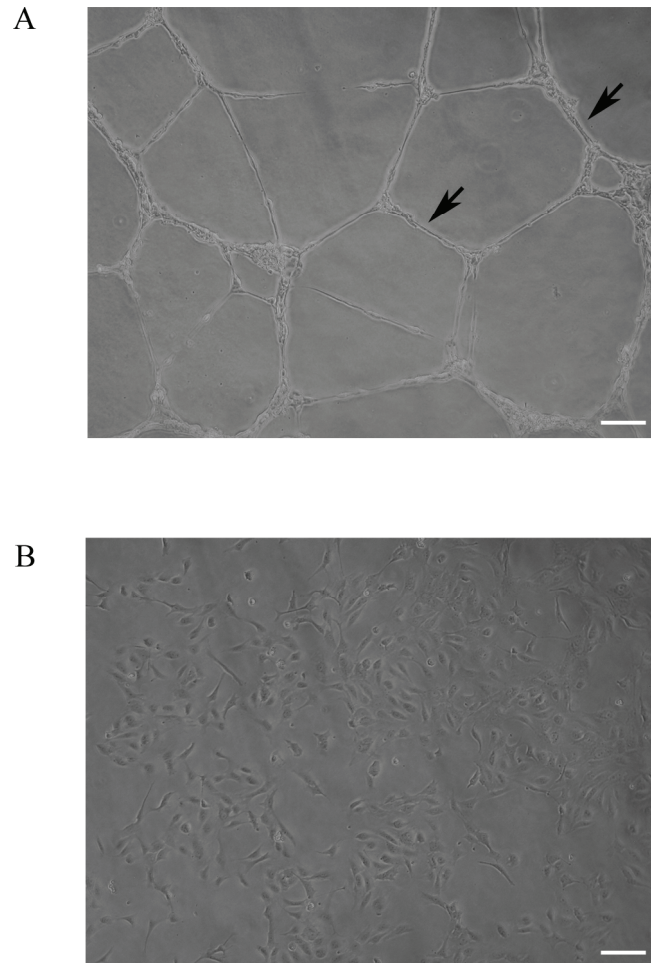
Supplementary Figure S1



Amplification plot, melt curve, and amplification sensitive curve of GAPDH (A), Tyro3 (B), Axl (C), Mer (D) qPCR primer couple. Panel E shows amplicon migration in agarose 2% gel. Each amplicon has been sequenced as described in the material and methods section.

Supplementary Figure S2. The ability of EC to form tubular networks is VEGFR-2 dependent as is suppressed in the presence of anti-VEGFR-2 antibodies.

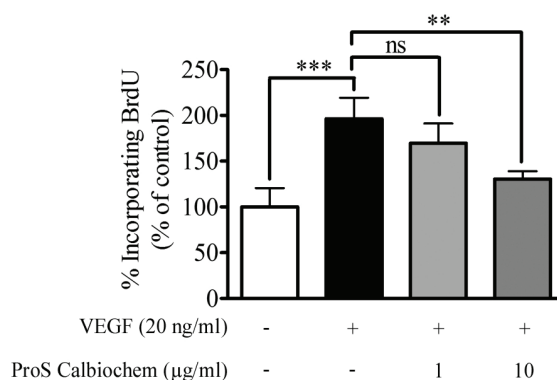
Supplementary Figure S2



Panel **A** is a representative image of capillary-like networks formed by ECs plated on Matrigel, while panel **B** shows the incapacity of ECs to form such networks when treated with antibodies raised against VEGFR-2. Each white scale bar represents 100 μm .

Supplementary Figure S3. Human ProS, from “Calbiochem” effectively inhibits VEGF-A induced BrdU incorporation in ECs.

Supplementary Figure S3



The experiments were performed under identical experimental conditions to those described for Figure 3A in the full manuscript except that here a human protein S from Calbiochem was tested. Percentage of BrdU incorporation induced by ProS (from Calbiochem) at 1 and 10 μg/ml in growth factor-depleted medium supplemented with VEGF (20 ng/ml). BrdU incorporation was measured by ELISA. Data obtained from 3 independent experiments (3 independent 96 well plates) each in triplicates wells are expressed as percentages of control ± SD *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; ns: non significant.

Supplementary figure S4. Absence of Gas6 contaminant in commercial purified ProS used in our study (Enzyme Research Laboratories).

Panel A: Match to: **PROS_HUMAN** Score: **458**

Vitamin K-dependent protein S OS=Homo sapiens GN=PROS1 PE=1 SV=1

Nominal mass (M_r): **77127**; Calculated pI value: **5.48**

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **11%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MRVLGGRCGA LLACLLLVLP VSEANFLSKQ QASQVLVRKR RANSLLEETK
51 QGNLERECIE ELCNKEEARE VFENDPETDY FYPKYLVLCLR SFQTGLFTAA
101 RQSTNAYPDL RSCVNAIPDQ CSPLPCNEDG YMSCKDGKAS FTCTCKPGWQ
151 GEKCEFDINE CKDPSNINGG CSQICDNTPG SYHCCKNGF VMLSNKKDCK
201 DVDECSLKPS ICGTAVCKNI PGDFECECPE GYRYNLKSKS CEDIDECSEN
251 MCAQLCVNYP GGYTCYCDGK KGFKLAQDQK SCEVVSVCPLP LNLDTKYELL
301 YLAEQFAGVV LYLKFRLEPEI SRFSAEFDFR TYDSEGVILY AESIDHSAWL
351 LIALRGGKIE VQLKNEHTSK ITTGGDVINN GLWNMVSVEE LEHSISIKIA
401 KEAVMDINKP GPLFKPENGL LETKVYFAGF PRKVESELIK PINPRLDGCI
451 RSWNLMKQGA SGIKEIIQEK QNKHCLVTVE KGSYYPGSGI AQFHIDYNNV
501 SSAEGWHVNV TLNIRPSTGT GVMLALVSGN NTVPPFAVSLV DSTSEKSQDI
551 LLSVENTVIY RIQALSLCSD QQSHLEFRVN RNNLELSTPL KIETISHEDL
601 QRQLAVLDKA MKAKVATYLG GLPDVPFSAT PVNAFYNGCM EVNINGVQLD
651 LDEAISKHND IRAHSCPSVW KKTKNS

```

Panel B:

Match to: **GAS6_HUMAN** Score: **273**

Growth arrest-specific protein 6 OS=Homo sapiens

Nominal mass (M_r): **81678**; Calculated pI value: **5.84**

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **6%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MAPSLSPGPA ALRRAPQLLL LLLAAECALA ALLPAREATQ FLRPRQRRAF
51 QVFEEAKQGH LERECVEELC SREEAREVFE NDPETDYFYP RYLDCKINKYG
101 SPYTKNSGFA TCVQNLDPDQC TPNPCDRKGT QACQDLMGNF FCLCKAGWGG
151 RLCDKDVNEC SQENGGCLQI CHNKPGSFHC SCHSGFELSS DGRTQCQDIDE
201 CADSEACGEA RCKNLPGSYS CLCDEGFAYS SQEKACRDVD ECLQGRCEQV
251 CVNSPGSYTC HCDGRGGLKL SQDMDTCELE AGWPCPRHRR DGSPAARPGR
301 GAQGSRSSEGH IPDRRGPRPW QDILPCVPFS VAKSVKSLYL GRMFSGTPVI
351 LRFKRLQPT RLVAEFDFRT FDPGILLFA GGHQDSTWIV LALRAGRLEL
401 QLRYNGVGRV TSSGPVINHG MWQTISVEEL ARNLVIKVN R DAVMKIIVAG
451 DLFQPERGLY HLNLTVGIGIP FHEKDLVQPI NPRLDGCMRS WNWLNEDTT
501 IQETVKVNTR MQCFSVTERG SFYPPSGFAF YSLDYMRTPL DVGTESTWEV
551 EVVAHIRPAA DTGVLFALWA PDLRAVPLSV ALVDYHSTKK LKKQLVVLAV
601 EHTALALMEI KVCDGQEHVV TVSLRDGEAT LEVDGTRGQS EVSAAQLQER

```

651 LAVLERHLRS PVLTFAGGLP DVPVTSAPVT AFYRGCMTLE VNR**RLLDLDE**
701 **AAYK**HSDITA HSCPPVEPAA A

Panel C:

Match to: **PROS_HUMAN** Score: **149**

Vitamin K-dependent protein S OS=Homo sapiens

Nominal mass (M_r): **77127**; Calculated pI value: **5.48**

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **23%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MRVLGGRCGA LLACLLLVLP VSEANFLSKQ QASQVLVRKR RANSLLEETK
51 QGNLERECIE ELCNKEEARE VFENDPETDY FYPK**YLVCLR SFQTGLFTAA**
101 **RQSTNAYPDL RSCVNAIPDQ CSPLPCNEDG YMSCKDGKAS FTCTCKPGWQ**
151 **GEKCEFDINE CKDPSNINGG CSQICDNTPG SYHCSCKNGF VMLSNKKDCK**
201 DVDECSLKPS ICGTAVCK**NI PGDFECECPE GYR**YNLKS KS CEDIDECSEN
251 MCAQLCVNYP GGYTCYCDGK KGFKLAQDQK SCEVVSVC LP LNLDTKYELL
301 YLAEQFAGVV LYLK**FRLPEI SRFSAEFDFR** TYDSEGVILY AESIDHSAWL
351 LIALRGGKIE VQLKNEHTSK ITTGGDVINN GLWNMVSVEE LEHSISIKIA
401 KEAVMDINKP GPLFKPENGL LETK**VYFAGF PRKVESELIK PINPR**LDGCI
451 RSWNLMK**QGA SGIKEIIQEK QNKHCLVTVE KGS**YYPGSGI AQFHIDYNNV
501 SSAEGWHVNV TLNIRPSTGT GVMLALVSGN NTVPPFAVSLV DSTSEKSQDI
551 LLSVENTVIY RIQALSLCSD QQSHLEFRVN **RNNLELSTPL KIETISHEDL**
601 **QRQLAVLDKA** MKAKVATYLG GLPDVPFSAT PVNAFYNGCM EVNINGVQLD
651 LDEAISKHND IR**AHSCPSVW KKT**KNs

Panel D:

GAS6_HUMAN Score: **115**

Growth arrest-specific protein 6 OS=Homo sapiens GN=GAS6 PE=1 SV=2

Nominal mass (M_r): **81678**; Calculated pI value: **5.84**

Taxonomy: [systematic](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **2%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

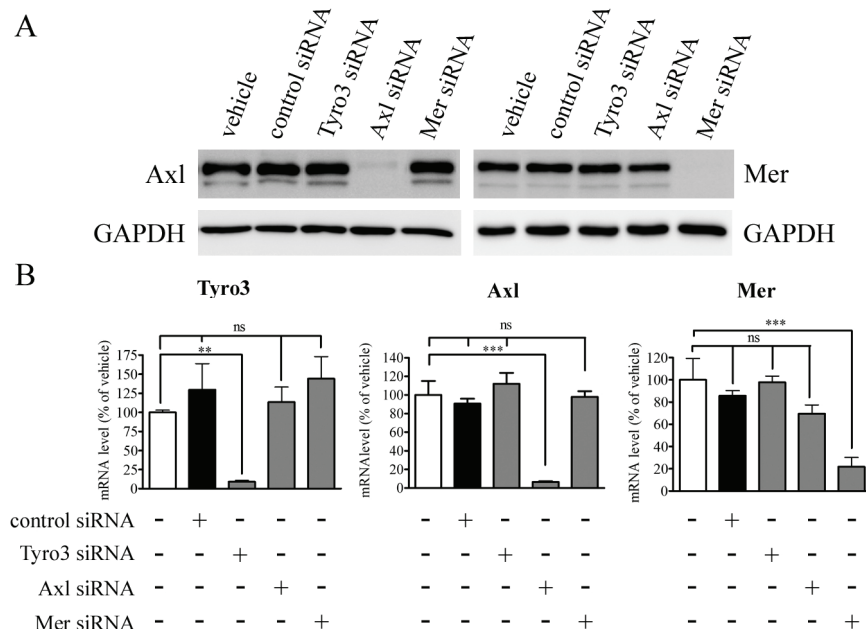
1 MAPSLSPGPA ALRRAPQLLL LLLAAECALA ALLPAREATQ FLRPRQRRAF
51 QVFEEAKQGH LERECVEELC SREEAREVFE NDPETDYFYP RYLDCKINKYG
101 SPYTKNSGFA TCVQNLDPQC TPNPCDRKGT QACQDLMGNF FCLCKAGWGG
151 RLCDKDVNEC SQENGGCLQI CHNKPGSFHC SCHSGFELSS DGRTCQDIDE
201 CADSEACGEA RCKNLPGSYS CLCDEGFAYS SQEKACRDVD ECLQGRCEQV
251 CVNSPGSYTC HCDGRGGLKL SQDMDTCELE AGWPCPRHRR DGSPAARPGR
301 GAQGSRSEGH IPDRRGPRPW QDILPCVPFS VAKSVKSLYL GRMFSGTPVI
351 RLRFKRLQPT RLVAEFDFRT FDPEGILLFA GGHQDSTWIV LALRAGRLEL
401 QLRYNGVGRV TSSGPVINHG MWQTISVEEL ARNLVIKVN R DAVMKI AVAG
451 DLFQPERGLY HLNLTVGGIP FHEK**DLVQPI NPR**LDGCMRS WNWLNGEDTT
501 IQETVKVNTR MQCFSVTERG SFYPGSGFAF YSLDYMRTPL DVGTESTWEV
551 EVVAHIRPAA DTGVLFALWA PDLRAVPLSV ALVDYHSTKK LKKQLVVLAV
601 EHTALALMEI KVCDGQEHVV TVSLRDGEAT LEVDGTRGQS EVSAAQLQER
651 LAVLERHLRS PVLTFAGGLP DVPVTSAPVT AFYRGCMTLE VNR**RLLDLDE**
701 **AAYK**HSDITA HSCPPVEPAA A

First, ProS preparation (20 μg) were subjected to a Nano-liquid chromatography on a C18 column with a 20-85 % acetonitrile gradient coupled to mass spectrometry. The only peak observed (at 45% acetonitrile) corresponded to Human ProS mass. Furthermore, a more sensitive technique consisting in analyzing tryptic digest fragments of the protein preparations under study by nano-UPLC coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS). We first determined using this approach that the lowest threshold (in term of concentration) for detecting Gas6 is 35 ng/ μl per injection (4 μl). We then added this amount to the highest concentration of human ProS that could be solubilized (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and were able to detect the presence of Gas6 in the mixture. We then analyzed pure human ProS (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and did not detect the presence of Gas6. We show in **Panel A**, the results obtained when tryptic digests of commercial pure ProS (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) were analyzed, 8 tryptic fragments that matched with human ProS sequence with a score of **458** were detected and no fragments matching Gas6 sequence were detected. We show in **Panel B**, the results obtained when tryptic digests of commercial pure Gas6 (35 ng/ μl) was analyzed, 3 tryptic fragments that matched with human Gas6 with a score of **273** were detected. We show in panels **C** and **D**, the results obtained when we first prepared a mixture containing ProS (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and Gas6 (17.5 ng/ μl) were subjected to trypsin and the tryptic digest fragments were analyzed. 8 tryptic fragments that matched with human ProS with a score of **149** and 2 tryptic fragments that matched with human Gas6 with a score of **115** were detected implying that if Gas6 was present in protein S preparation used in the analysis depicted in **panel A** we would have detected it. To perform these experiments the following method was followed. The reduced and alkylated proteins were digested overnight at 37°C with trypsin (trypsin:protein, 1:20, w/w). The digestion was stopped with trifluoroacetic acid (pH 2-3). The tryptic peptides were dried under vacuum and then resuspended in a solution of 0.1% formic acid before analysis by MS. Mass

spectrometric analysis was carried out using a quadrupole-time of flight hybrid mass spectrometer equipped with a TWIM cell (Synapt HDMS G2, Waters Corp., Manchester) coupled with a Nano-UPLC (nanoAcquity, Waters Corp., Manchester). The tryptic peptides were desalted on a 180 μ m internal diameter/20 mm length C18 nanoAcquity column (Symmetry, Waters Corp., Manchester) and then loaded on a 75 μ m internal diameter/150 mm length C18 nanoAcquity column (BEH130 C18, Waters Corp., Manchester). The peptide mixture was eluted with 3% to 95% acetonitrile containing 0.1% formic acid over 45 minutes at a flow rate of 300 nl/min. Mass data acquisitions were piloted by Masslynx software (Micromass) using automatic switching between MS and coupled tandem mass spectrometry (MS/MS) modes. The survey scan (0.5s) was obtained over the mass range of m/z 500 to 2000 in the positive ion mode with a cone voltage of 25 V. When the signal reached a user-defined threshold (900 counts/s), peptide precursor ions could be selected for MS/MS scan (3s) over the mass range m/z 50-2000. Fragmentation was performed using argon as the collision gas and with a collision energy profile (20-50 eV) optimized for various mass ranges of precursor ions. The selected precursor ions were automatically included in the exclusion list. The database search was performed with the MASCOT search tool (Matrix Science, London, United Kingdom) screening SWISS-PROT. The following search settings were used: maximum missed cleavages: 1; Peptide Mass Tolerance : \pm 10 ppm; MS/MS fragment tolerance: \pm 0.1 Da; minimum ion score confidence interval for peptides: 90%; Mass values: Monoisotopic. Carbamidomethyl (c) and Oxidation (M) were respectively selected as fixed and variable modifications.

Supplementary Figure S5. Analysis of TAM receptors expression 48 hours post siRNA silencing.

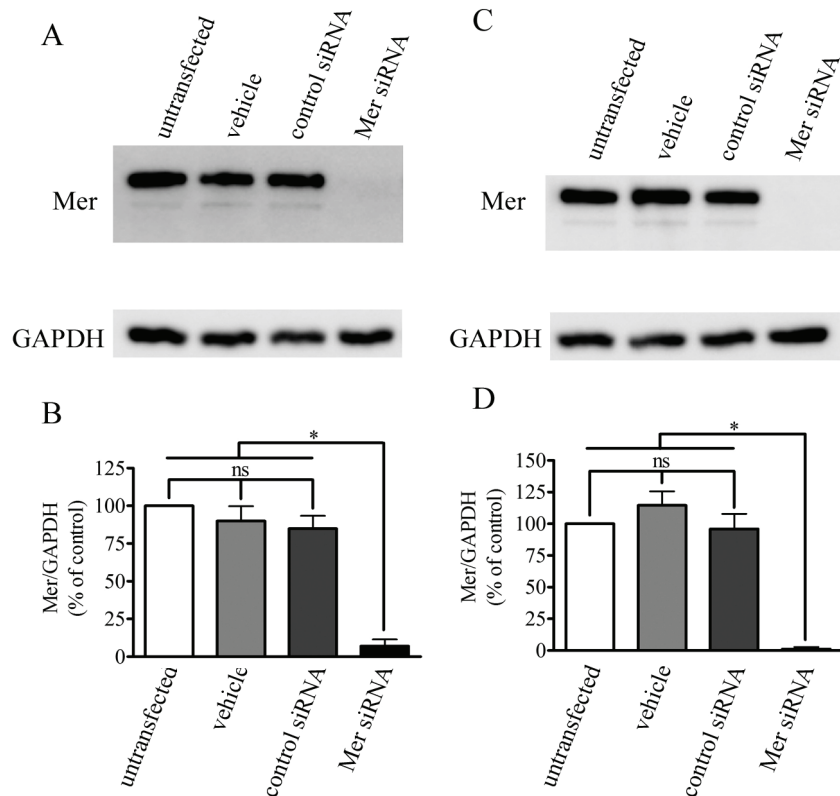
Supplementary Figure S5



Panels **A** and **B** depict the effectiveness and the specificity of targeted siRNA silencing of Tyro3, Axl and Mer gene expression studied by western blot analysis (**A**) or by real-time qPCR (**B**) 48 hours post siRNA transfection. Protocol used is the same as described in Figure 6. Data were obtained from 3 independent experiments each in triplicate \pm SD *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; ns: non significant. For panel **A**, equivalent amounts of protein were resolved by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and probed with either anti-Mer, anti-Axl or anti-GAPDH antibodies.

Supplementary figure S6. Western blot analysis confirming Mer receptors gene silencing 24 and 48 hours post transfection with 5 nM siRNA

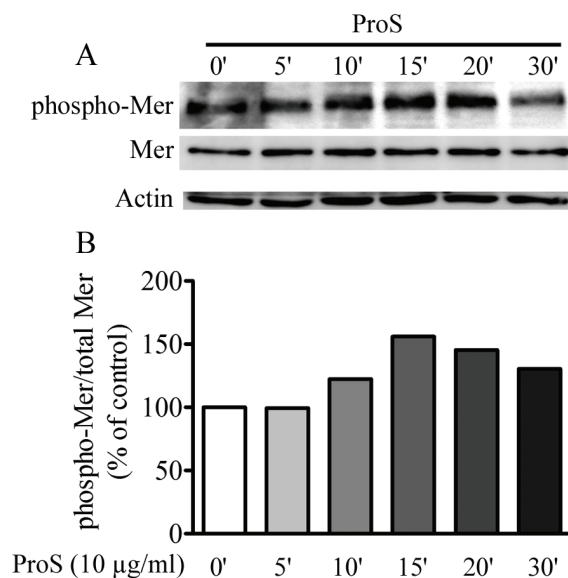
Supplementary Figure S6



Panels A and C depicts analysis of Mer expression respectively 24 and 48 hours post transfection of ECs with either siRNA control or Mer siRNA used at 5 nM in comparison with untransfected cells that were exposed or not to the transfecting agent (vehicle). Equivalent amounts of protein were resolved by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and probed with either anti-Mer, or anti-GAPDH antibodies. Intensity of bands was quantified and is represented in panels B for 24 hours post-transfection and D for 48 hours post-transfection as a percentage of control of the ratio of Mer over GAPDH. Data were obtained from 3 independent experiments are expressed as percentages of control \pm SD * $P < 0.05$; ns: non significant.

SupplementaryFigure S7. Mouse tyrosine kinase receptor Mer is activated by human ProS

Supplementary Figure S7



In panel A, Sub-confluent mouse TM4 cells (a murine Sertoli cell line known to express Mer receptor Tang H et al., *Haematologica*. 2009) were exposed to human ProS (10 µg/ml) for the indicated times and equal amounts of protein extracts were resolved by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and probed sequentially with anti-phosphorylated Mer, anti-Mer and anti-actin antibodies. Anti-mouse phospho-Mer, and anti-mouse Mer 101-AP antibodies from FabGennix (FabGennix Inc., Frisco, TX). The anti-actin antibody was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Sub-confluent mice TM4 cells (a mice Sertoli cell line known to express Mer receptor) were exposed to human ProS (10µg/ml), lysed and equivalent amounts of proteins from each sample were resolved by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and probed with either anti-phosphorylated Mer or anti-GAPDH antibodies. In panel B, each phospho-Mer band intensity was quantified and expressed as a ratio of its corresponding total Mer protein band. Values for control untreated cells were assigned a ratio of 100%.

Mécanismes cellulaires et moléculaires activés par le facteur anticoagulant, la protéine S, sur les cellules endothéliales et lors de l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus physiologique qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant et est régulée par l'équilibre entre les facteurs endogènes pro- et anti-angiogéniques. La rupture de cet équilibre est associée à de nombreuses pathologies dont l'ischémie, la rétinopathie ou encore la progression tumorale. Etant donné que les cellules endothéliales, principal type cellulaire composant les vaisseaux sanguins expriment les récepteurs à activité tyrosine kinase du facteur anticoagulant, la protéine S, Tyro3, Axl et Mer et produisent de la protéine S, l'objectif de ce travail est d'étudier le rôle, de la protéine S dans l'angiogenèse. Dans la première partie de ce travail, nous avons montré *in vivo* que la protéine S inhibe l'angiogenèse induite par les facteurs pro-angiogéniques (VEGFA et FGF2). Parallèlement, nous avons observé *in vitro* une inhibition par la protéine S de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales induites par le VEGFA. Cet effet est corrélé à l'inhibition par la protéine S des voies de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2 et de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) induites par le VEGFA. Nous avons ensuite mis en évidence, par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et de petits ARN interférents, que la protéine S inhibe, via l'activation du récepteur Mer et le recrutement de la protéine phosphatase SHP2, l'activation du VEGFR2, le principal récepteur du VEGFA. Dans la deuxième partie, nous avons montré de manière intéressante que le rôle joué par la protéine S lors de l'angiogenèse est plus complexe, puisqu'elle est capable d'activer directement la voie de signalisation des MAP-Kinases Erk 1/2 et d'induire la prolifération des cellules endothéliales. Ces effets cellulaires et moléculaires requièrent l'activation du récepteur Mer, puis le recrutement de la protéine kinase SRC permettant alors l'activation de la protéine phosphatase SHP2 responsable de l'activation de la voie des MAP-Kinases Erk 1/2. Nos résultats décrivent pour la première fois un rôle régulateur de la protéine S sur l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*, ce qui ouvre la voie au développement de nouveaux traitements pro- ou anti-angiogéniques.

Mots clés : Protéine S, angiogenèse, prolifération, migration, voies de signalisation, VEGFA

Doctorat de l'Université de Poitiers : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

CNRS FRE 3511, Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires

Bât B36, Pôle Biologie Santé – 1, rue Georges Bonnet BP633 - 86022 Poitiers Cedex, France